

**Marcel Leite**



**Caracterização molecular de rotavírus como causador de  
diarréia em população de duas regiões geográficas do Brasil**

Dissertação apresentada à Universidade  
Federal de São Paulo – Escola Paulista  
de Medicina para obtenção do título de  
Mestre em Ciências pelo programa de  
pós-graduação em Infectologia.

São Paulo

2013

**Marcel Leite**

**Caracterização molecular de rotavírus como causador de  
diarréia em população de duas regiões geográficas do Brasil**

Dissertação apresentada à Universidade  
Federal de São Paulo – Escola Paulista  
de Medicina para obtenção do título de  
Mestre em Ciências pelo programa de  
pós-graduação em Infectologia.

**Orientador:** Prof. Dr. Celso Francisco Hernandes Granato  
**Co-orientadora:** Dra. Rita de Cássia Campagnoli Carmona

São Paulo  
2013

## FICHA CATALOGRÁFICA

Leite, Marcel

**Caracterização molecular de rotavírus como causador de diarreia em população de duas regiões geográficas do Brasil. /**

Marcel Leite -- São Paulo, 2013.

xvii, 107f.

Tese (Mestrado) – Universidade Federal de São Paulo. Escola Paulista de Medicina. Programa de Pós-graduação em infectologia.

Título em inglês: Molecular Characterization of rotaviruses as etiological agents of diarrhoea in general populations of two geographic regions of Brazil.

1. Rotavirus. 2. Epidemiologia. 3. Genótipo. 4. Vacina.

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO PAULO**  
**ESCOLA PAULISTA DE MEDICINA**  
**DEPARTAMENTO DE MEDICINA**  
**DISCIPLINA DE INFECTOLOGIA**

**Chefe do Departamento: Prof. Dr. Álvaro Nagib Atallah**

**Chefe da Disciplina: Prof. Dr. Celso Francisco Hernandez Granato**

**Coordenador do Curso de Pós-graduação: Prof. Dr. Ricardo Sobhie Diaz**

**MARCEL LEITE**

**Caracterização molecular de rotavírus como causador de diarreia em população de duas regiões geográficas do Brasil**

**Presidente da banca:**

Prof. Dr. Celso Francisco Hernandez Granato

**BANCA EXAMINADORA**

**Titulares:**

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Lily Yin Weckx - Universidade Federal de São Paulo

Prof. Dr. Jorge Luiz Mello Sampaio - Universidade de São Paulo

Dr. Aripuanã Sakurada Aranha Watanabe - Universidade Federal de São Paulo

**Suplente:**

Prof. Dr. Luiz Mário Ramos Janini - Universidade Federal de São Paulo

Aos meus pais, Nelson e Sueli, por toda  
dedicação e incentivo dispensados  
ao longo de toda minha vida.

A minha futura esposa, Eleine, por todo  
apoio e incentivo dispensados ao longo  
de todas as etapas dessa jornada.

## **AGRADECIMENTOS**

Aos meus familiares, pelo incentivo, dedicação e torcida durante essa jornada.

Ao meu orientador Dr. Celso Granato, pela oportunidade de realizar este estudo, pelo aprendizado, pelo exemplo de profissionalismo e pela contribuição em meu desenvolvimento acadêmico e profissional.

Ao colega Emerson Carraro, pelo aprendizado e pela idéia que levou a realização deste estudo.

Aos amigos do laboratório de virologia da UNIFESP, em especial Ari e Rodrigo, que ajudaram na elaboração do projeto inicial e contribuíram para o meu crescimento acadêmico.

A Dra. Jeane Tsutsui, que acreditou neste estudo e sugeriu a parceria com o Grupo Fleury S/A.

Aos colegas do IPD (Grupo Fleury S/A), em especial ao Rodrigo, Karla e Jéssica, que ajudaram na padronização da metodologia.

Ao Instituto Adolfo Lutz, representado pela Dra. Maria do Carmo Timenetsky, pela parceria e por ter cedido os controles positivos.

A Dra. Rita de Cássia, pela ajuda dispensada em diferentes etapas deste estudo, pelos conselhos e pelos ensinamentos, que contribuíram muito para meu crescimento acadêmico e o desenvolvimento deste estudo.

A amiga Andréia, pelos conselhos e pela ajuda dispensada no desenvolvimento das diferentes etapas deste estudo.

Aos amigos da Automação (Grupo Fleury S/A), pelo respeito, amizade e profissionalismo, que contribuíram ativamente para o meu desenvolvimento pessoal e profissional.

Aos colegas da Parasitologia de todas as unidades técnicas do Grupo Fleury S/A, em especial ao Reginaldo e Márcio, que ajudaram ativamente na separação das amostras que foram utilizadas neste estudo.

A Universidade Federal de São Paulo por ter proporcionado a realização deste estudo.

Ao Grupo Fleury S/A, por ter acreditado no estudo e pelo fornecimento de apoio técnico e financeiro.

E a todos aqueles que participaram, direta ou indiretamente, da concretização deste estudo.



## SUMÁRIO

|  |      |
|--|------|
| LISTA DE FIGURAS.....  | x    |
| LISTA DE TABELAS .....   | xii  |
| LISTA DE QUADROS .....   | xiii |
| LISTAS DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS.....                             | xiv  |
| RESUMO.....  | xvi  |
| ABSTRACT .....   | xvii |
| 1- INTRODUÇÃO .....  | 18   |
| 1.1 Histórico .....  | 19   |
| 1.2 Características do vírus.....                                  | 20   |
| 1.3 Fisiopatologia .....   | 26   |
| 1.4 Imunidade.....   | 29   |
| 1.5 Diagnóstico Laboratorial.....                                  | 30   |
| 1.6 Epidemiologia.....   | 31   |
| 1.7 Vacinação.....   | 36   |
| 2- OBJETIVOS .....   | 43   |
| 2.1 Objetivo Geral .....   | 44   |
| 2.2 Objetivos específicos.....                                     | 44   |
| 3- MATERIAIS E MÉTODOS.....  | 45   |
| 3.1 Amostras de fezes.....   | 46   |
| 3.2 Pesquisa de rotavírus.....                                     | 47   |
| 3.3 Dados sobre vacinação .....                                    | 47   |
| 3.4 Preparo da suspensão de fezes .....                            | 47   |
| 3.5 Amostras padrão .....  | 48   |
| 3.6 Extração do RNA viral .....                                    | 48   |
| 3.6.1 Extração manual (QIAamp® Viral RNA Mini).....                | 48   |
| 3.6.2 Extração automatizada (QIAasympny® Vírus/Bactéria Mini)..... | 49   |
| 3.7 Realização da 1ª PCR (RT-PCR).....                             | 50   |
| 3.7.1 Primers utilizados.....                                      | 50   |
| 3.7.2 1ª PCR (VP7 e VP4) .....                                     | 51   |
| 3.8 Realização da 2ª PCR (Semi-nested) .....                       | 52   |
| 3.8.1 Primers utilizados.....                                      | 53   |
| 3.8.2 2ª PCR para proteína VP7 .....                               | 53   |

---

|        |  |     |
|--------|--|-----|
| 3.8.3  | 2ª PCR para proteína VP4 .....                               | 54  |
| 3.9    | Eletroforese em gel de agarose .....                         | 55  |
| 3.10   | Testes confirmatórios .....                                  | 58  |
| 3.10.1 | Amostras com genotipagem negativa para VP7 e/ou VP4 .....    | 58  |
| 3.10.2 | Teste para diferenciação entre genótipos P[8] e P[9] .....   | 60  |
| 3.10.3 | Teste para diferenciação entre genótipos G1 e G9 .....       | 61  |
| 3.10.4 | Diluição 1/100 .....   | 62  |
| 4-     | RESULTADOS .....   | 63  |
| 4.1    | Padronização das reações de PCR (RT-PCR e Semi nested) ..... | 64  |
| 4.2    | Caracterização demográfica .....                             | 64  |
| 4.3    | Caracterização sazonal .....                                 | 68  |
| 4.4    | Caracterização vacinal .....                                 | 70  |
| 4.5    | Caracterização genotípica .....                              | 70  |
| 5-     | DISCUSSÃO .....  | 74  |
| 6-     | CONCLUSÕES .....   | 84  |
| 7-     | REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....                             | 86  |
| 8-     | ANEXOS .....   | 104 |

## LISTA DE FIGURAS

|   |    |
|---|----|
| Figura 1: Ilustração esquemática das camadas que compõem o virion .....   | 21 |
| Figura 2: Representação esquemática do virion de Rotavírus .....  | 23 |
| Figura 3: Representação esquemática do rearranjo genético entre cepas de origem humana com cepa de origem simia, que ocorre durante o processo de fabricação da vacina Rotashield™ .....  | 38 |
| Figura 4: Número de mortes por diarreia, no México, em crianças (0-4 anos) entre os meses de Dezembro e Maio dos anos de 2003 a 2010.....   | 42 |
| Figura 5: Esquematização da formação e amplificação do cDNA ocorridas na reação de 1º PCR a partir do RNA extraído. ....  | 51 |
| Figura 6: Esquematização da formação do cDNA, referente ao genótipo de rotavírus presente na amostra, ocorrida na reação de 2º PCR a partir do cDNA formado no 1º PCR.....  | 53 |
| Figura 7: Exemplo da migração de bandas ao longo do gel de agarose para os pesos moleculares 50 pb DNA ladder (A) e 1 Kb plus DNA ladder (B) após a eletroforese.....   | 57 |
| Figura 8: Fluxograma para confirmação de amostras que apresentaram resultado negativo na genotipagem de VP7 e VP4 .....   | 59 |
| Figura 9: A) Fluxograma para confirmação de amostras que apresentaram resultado negativo na genotipagem de VP7 e resultado positivo na genotipagem de VP4. B) Fluxograma para confirmação de amostras que apresentaram resultado positivo na genotipagem de VP7 e resultado negativo na genotipagem de VP4 .....  | 60 |
| Figura 10: Eletroforese em gel de agarose dos produtos obtidos com a RT-PCR para VP7 e VP4. Canaletas (1, 9 e 17) – Peso molecular 1 Kb / Canaletas (2 a 6) – VP7 / Canaletas (10 a 14 e 18) – VP4 / Canaletas (7 e 15) – controle negativo (H <sub>2</sub> O) usado na RT-PCR de VP7 e VP4, respectivamente / Canaletas (8 e 16) – controle positivo usado na RT-PCR de VP7 e VP4, respectivamente .....                       | 64 |
| Figura 11: Eletroforese em gel de agarose dos produtos obtidos com a PCR Semi-nested para VP7 e VP4. Canaletas (1, 10 e 19) – Peso molecular 50 pb / Canaletas (2 a 7) – VP7 / Canaletas (11 a 16) – VP4. Canaletas (8 e 17) – controle negativo (H <sub>2</sub> O) usado na PCR Semi-nested de VP7 e VP4, respectivamente. Canaletas (9 e 18) – controle positivo usado na PCR Semi-nested de VP7 e VP4, respectivamente ..... | 65 |
| Figura 12: Classificação das amostras que não confirmaram presença de rotavírus na reação de PCR de acordo com o sexo dos pacientes .....   | 66 |

|   |    |
|---|----|
| Figura 13: Classificação das amostras que confirmaram e não confirmaram a presença do rotavírus na reação de PCR de acordo com a data da coleta .....             | 66 |
| Figura 14: Classificação das amostras com resultado positivo para rotavírus na reação de PCR, de acordo com a data de coleta .....                                | 68 |
| Figura 15: Classificação das amostras, provenientes da região Sudeste, com resultado positivo para rotavírus na reação de PCR, de acordo com a data de coleta ..  | 69 |
| Figura 16: Classificação das amostras, provenientes da região Nordeste, com resultado positivo para rotavírus na reação de PCR, de acordo com a data de coleta .. | 69 |

## LISTA DE TABELAS

|   |    |
|---|----|
| Tabela 1: Classificação das amostras que não confirmaram presença de rotavírus na reação de PCR de acordo com a faixa etária dos pacientes .....  | 65 |
| Tabela 2: Classificação das amostras com resultado positivo para rotavírus na reação de PCR, de acordo com a faixa etária dos pacientes .....   | 67 |
| Tabela 3: Classificação das amostras com resultado positivo para rotavírus na reação de PCR, de acordo com a região brasileira de origem .....  | 68 |
| Tabela 4: Classificação das amostras de pacientes entre 0 e 4 anos com resultado positivo para rotavírus na reação de PCR, de acordo com a informação sobre a vacinação contra o rotavírus .....                                      | 70 |
| Tabela 5: Classificação das amostras de pacientes entre 0 e 4 anos com resultado positivo para rotavírus na reação de PCR, de acordo com a informação sobre a vacinação contra o rotavírus para cada região brasileira estudada ..... | 70 |
| Tabela 6: Genótipos correspondentes aos pacientes com idade entre 0 e 4 anos, que souberam informar se foram ou não vacinados contra rotavírus .....  | 73 |

## LISTA DE QUADROS

|   |    |
|---|----|
| Quadro 1: Relatos de alguns autores a respeito da circulação de cepas de rotavírus. .36   | 36 |
| Quadro 2: <i>Primers</i> , correspondentes à VP7 e VP4, utilizados na 1ª PCR (RT-PCR)....51   | 51 |
| Quadro 3: Quantidade de reagentes utilizados na reação do 1º PCR para as proteínas VP7 e VP4. ....52  | 52 |
| Quadro 4: Programação utilizada no termociclador para a reação do 1º PCR para VP7 e VP4.....52  | 52 |
| Quadro 5: <i>Primers</i> , correspondentes às proteínas VP7 e VP4, utilizados na 2ª PCR (Semi-nested) .....54   | 54 |
| Quadro 6: Quantidade de reagentes utilizados na reação do 2º PCR para a proteína VP7.....54   | 54 |
| Quadro 7: Quantidade de reagentes utilizados na reação do 2º PCR para a proteína VP4.....55   | 55 |
| Quadro 8: Programação utilizada no termociclador para a reação do 2º PCR para VP7 e VP4.....55  | 55 |
| Quadro 9: Tamanho do segmento de DNA formado na 2ª PCR (Semi-nested) correspondente a cada genótipo de VP7 e VP4.....58                                   | 58 |
| Quadro 10: Classificação das amostras que não confirmaram presença de rotavírus na reação de PCR de acordo com a região brasileira de origem .....66      | 66 |
| Quadro 11: Classificação das amostras com resultado positivo para rotavírus na reação de PCR, de acordo com o sexo dos pacientes .....67                  | 67 |
| Quadro 12: Classificação das amostras que confirmaram presença de rotavírus, de acordo com o genótipo correspondente a proteína VP7 .....71               | 71 |
| Quadro 13: Classificação das amostras que confirmaram presença de rotavírus, de acordo com o genótipo correspondente a proteína VP4.....71                | 71 |
| Quadro 14: Classificação das amostras que confirmaram presença de rotavírus, de acordo com as associações encontradas entre os genótipos de VP7 e VP4 .72 | 72 |
| Quadro 15: Classificação das cepas de rotavírus encontradas de acordo com a região brasileira de origem .....73   | 73 |

## LISTAS DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

|                                   |  |
|-----------------------------------|--|
| BA                                | Bahia  |
| Ca <sup>+2</sup>                  | Íon cálcio   |
| CD4 <sup>+</sup> , 8 <sup>+</sup> | Cluster of differentiation – Grupamento de diferenciação   |
| cDNA                              | Complementary deoxyribonucleic acid – Ácido Desoxirribonucleico complementar                             |
| dATP                              | Deoxyadenosine triphosphate – Desoxiadenosina Trifosfatada   |
| dGTP                              | Deoxyguanosine triphosphate – Desoxiguanosina Trifosfatada   |
| dCTP                              | Deoxycytine triphosphate – Desoxicitidina Trifosfatada   |
| dTTP                              | Deoxythymidine triphosphate – Desoxitimidina Trifosfatada  |
| dsRNA                             | Double strain ribonucleic acid – Fita dupla de ácido ribonucléico  |
| DNA                               | Deoxyribonucleic acid – Ácido Desoxirribonucleico  |
| EUA                               | Estados Unidos da América  |
| EDTA                              | Ethylenediamine tetraacetic acid-Ácido etilenodiamino tetra-acético                                      |
| G?                                | Genótipo G não definido  |
| HCl                               | Ácido clorídrico   |
| KCl                               | Cloreto de Potássio  |
| mRNA                              | Messenger Ribonucleic acid - Ácido ribonucléico mensageiro   |
| NSP                               | No structural protein – Proteína não estrutural  |
| PBS                               | Phosphate buffered saline – Tampão fosfato salino  |
| PE                                | Pernambuco   |
| pH                                | Potencial de hidrogênio  |
| P?                                | Genótipo P não definido  |
| RVA                               | Rotavírus do grupo A   |
| RT-PCR                            | Reverse Transcription polymerase chain reaction – Reação em cadeia de polimerase com transcrição reversa |
| RNA                               | Ribonucleic acid - Ácido ribonucléico  |
| RER                               | Retículo endoplasmático rugoso   |
| RJ                                | Rio de Janeiro   |
| SP                                | São Paulo  |
| S/A                               | Sociedade anônima  |

|            |                              |
|------------|------------------------------|
| Da         | Dalton                       |
| g          | Grama                        |
| Kb         | Kilobase                     |
| KDa        | KiloDalton                   |
| mM         | Milimolar                    |
| mmol/L     | Milimol por litro            |
| mol/L      | Mol por litro                |
| mL         | Mililitro                    |
| nm         | Nanômetro                    |
| pb         | Pares de bases               |
| rpm        | Rotações por minuto          |
| trilhão/mL | Trilhão por mililitro        |
| V          | Volt                         |
| μm         | Micrômetro                   |
| μL         | Microlitro                   |
| μM         | Micromolar                   |
| °          | Grau                         |
| [NT]       | Não tipado                   |
| ®          | Marca registrada             |
| %          | Porcentagem                  |
| ™          | Trade Mark – Marca comercial |
| *          | Asterisco                    |
| -          | Menos                        |
| ‘          | Linha                        |
| °C         | Grau Celsius                 |
| Nº         | Número                       |



## RESUMO

Em escala global, o rotavírus é considerado como o principal causador da diarreia infantil grave, acometendo, principalmente, crianças entre 0 e 5 anos. Em março de 2006, a vacina Rotarix<sup>®</sup> (oral, cepa G1P[8] atenuada de origem humana) foi incluída no calendário vacinal brasileiro. Dados do ministério da saúde revelam que no ano de 2009 a cobertura nacional deste imunizante foi de 84,4%. Relatos sobre o aumento na circulação da cepa G2P[4], após 2006, trouxeram à tona a discussão ao redor da eficácia deste imunizante, para as cepas não G1. Considerando que a epidemiologia molecular do rotavírus pode apresentar dados para o aprimoramento do controle vacinal na população infantil, o objetivo deste estudo foi identificar os genótipos de rotavírus circulantes, em 2 regiões brasileiras, durante o ano de 2009. Um total de 223 amostras de fezes, provenientes das regiões Nordeste (Bahia e Pernambuco) e Sudeste (São Paulo e Rio de Janeiro), com resultado previamente positivo para rotavírus (Imunocromatografia) foram submetidas à técnica nested RT-PCR para serem genotipadas de acordo com as proteínas VP7 (G) e VP4 (P). A caracterização genotípica do rotavírus foi obtida em 175 amostras (78,5%). Para essas amostras, a idade dos pacientes variou entre 0 a 83 anos (média de 15,6 anos e mediana de 6 anos), sendo 46,3% na faixa de 0 a 5 anos, 50,9% eram indivíduos do sexo feminino e, com relação à região de origem, 52,6% foram provenientes da região Nordeste e 47,4% da região Sudeste. Em relação à sazonalidade, 59,0% (Sudeste) e 73,9% (Nordeste) das amostras genotipadas foram colhidas entre os meses de junho e setembro. Para a genotipagem de VP7, foi observada circulação dos genótipos G1, G2 e G4 (Nordeste) e G2, G3, G5 e G9 (Sudeste), enquanto que para VP4 foi observada circulação de P[4], P[8], P[6] e P[9] (Nordeste e Sudeste). As associações de G e P mais frequentes no Nordeste foram G2P[4]/G2P[NT] (81,4%), G2P[6] (5,2%) e G1P[6] (5,2%), enquanto que no Sudeste foram G2P[4]/G2P[NT] (78,8%), G2P[6] (8,2%) e G9P[8] (4,7%). Entre os indivíduos de 0 a 4 anos que foram imunizados contra o rotavírus (15,1%), o genótipo G2P[4]/G2P[NT] foi identificado em 91,0% e naqueles com mesma faixa etária que não foram imunizados (9,6%) o genótipo G2P[4]/G2P[NT] foi encontrado em 85,7%. Tais achados, em concordância com o alto índice de cobertura vacinal, sugerem que a circulação de G2P[4] nas regiões estudadas apresentou aumento considerável após a adoção da Rotarix<sup>®</sup> no calendário vacinal.

## ABSTRACT

Rotavirus is the main cause of severe childhood diarrhea globally among children under 5 years of age. In March 2006, the live attenuated human rotavirus vaccine Rotarix<sup>®</sup> (G1P[8] strain) was introduced into Brazil's National Immunization Programme. According to Ministry of Health data, the vaccine coverage rate was 84.4% in 2009. Evidences of increasing G2P[4] genotype circulation after 2006 opened up the discussion about the vaccine effectiveness to non-G1 strains. Considering that data of molecular epidemiology of rotaviruses can contribute to a better vaccine control in infants, the aim of this study was to identify the circulating rotavirus genotypes in two distinct Brazilian regions during 2009. A total of 223 fecal samples previously positive to rotavirus by immunochromatography and latex agglutination assay, from Northeastern (Bahia and Pernambuco) and Southeastern (Sao Paulo and Rio de Janeiro) regions were included in the study. All the samples were submitted to genotyping by nested-PCR according to VP7 (G) e VP4 (P) proteins and 175 samples (78.5%) could be characterized. The population ranged in age from 0 to 83 years (average 15.6 years and median 6 years), and 46.3% ranged from 0 to 5 years. Fifty one percent were females. The distribution according to geographic origin was 52.6% for Northeastern, and 47.4% for Southeastern. According to seasonality, 59.0% and 73.9% of genotyped samples were collected between June and September for Southeastern and Northeastern respectively. Analyzing the VP7 genotyping, the G types detected were G1, G2 and G4 (Northeast), and G2, G3, G5 and G9 (Southeast). Analyzing the VP4 genotyping, the P types detected were P[4], P[8], P[6] and P[9] (Northeast and Southeast). Additionally, the most frequent mixed types found were G2P[4]/G2P[NT] (81.4%), G2P[6] (5.2%) and G1P[6] (5.2%) in Northeast, and G2P[4]/G2P[NT] (78.8%), G2P[6] (8.2%) e G9P[8] (4.7%) in Southeast. Among immunized individuals ranged from 0 to 4 years (15.1%), the G2P[4]/G2P[NT] genotype was identified in 91.0% of cases, and among non-immunized individuals at the same age (9.6%), the G2P[4]/G2P[NT] genotype was identified in 85.7% of cases. In accordance with the high level of vaccine coverage, these data suggest that the circulation of G2P[4] genotype in Southeast and Northeast regions had a considerable increase after the introduction of Rotarix<sup>®</sup> into the National Immunization Programme.

## 1- INTRODUÇÃO

As gastroenterites agudas infantis representam expressiva causa de morbi-mortalidade em escala universal, sendo de maior impacto em países subdesenvolvidos, onde se sobrepõe o agravante da desnutrição. Neste contexto, a infecção pelo rotavírus se apresenta entre as seis principais causas mais importantes da diarreia infantil grave, correspondendo à taxa mundial de 30 a 50%, como agente etiológico dessa enfermidade, e sendo responsável por mais de 2 milhões de óbitos entre crianças com idade inferior a 5 anos (Estes e Kapikian, 2007). Além do rotavírus, destacam-se também, com relevância epidemiológica, norovírus, sapovírus, astrovírus e adenovírus, como agentes causadores de gastroenterites (Wilhelmi *et al*, 2003).

## 1.1 Histórico

Entre os anos 1963 e 1969, com auxílio da microscopia eletrônica, uma série de trabalhos relataram a presença de partículas virais com aproximadamente 70 nm de diâmetro, associadas à doença diarreica e ao tecido intestinal de ratos e macacos (Adam e Kraft, 1963; Malherb e Harwin, 1963; Malherb e Strickland-Cholmley, 1967). Em 1969, Mebus *et al.* reportaram casos de diarreia em bezerros, que foram ocasionadas pela inoculação oral ou pela aplicação no duodeno de material fecal, obtido a partir de outros casos de diarreia. A análise das fezes destes bezerros revelou que não havia bactérias causadoras de diarreia, mas sim a presença de numerosas partículas virais com diâmetro aproximado de 70 nm. Estas partículas apresentavam características morfológicas e propriedades químicas semelhantes ao grupo dos reovírus, porém distinguiram-se sorologicamente dos reovírus de tipo 1 e 3. Posteriormente, em 1971, Mebus *et al.* demonstraram sucesso no isolamento *in vitro* dos vírus causadoras da diarreia em bezerros de Nebraska (*Nebraska Calf Diarrhea Virus* – NCDV) e em 1972, Fernelius *et al.* reportaram que o NCDV apresentava semelhança morfológica aos reovírus, porém distinguia-se antigenicamente deste grupo de vírus.

O primeiro achado de rotavírus em seres humanos ocorreu na Austrália em 1973, descrito por Bishop *et al.* Através de um estudo em amostras de biópsia da mucosa duodenal de crianças com diarreia aguda de origem não bacteriana, foi detectada, à microscopia eletrônica, a presença de inúmeras partículas virais no interior das vesículas citoplasmáticas dilatadas. Estas partículas virais, encontradas em seis

dos nove casos estudados, foram classificadas de acordo com sua morfologia, como sendo pertencentes ao grupo dos Orbivírus. Neste mesmo ano, no Reino Unido, Flewett *et al.* estudaram a associação destes vírus com o quadro de gastroenterite aguda na infância, evidenciando, com o auxílio da técnica de contraste negativo ao microscópio eletrônico, a presença destas partículas virais nas amostras de fezes das crianças com diarreia aguda. Essas partículas apresentavam dupla camada protéica em sua conformação estrutural e, por isso, assemelhavam-se aos Reovírus. Em 1974, no Canadá, Middleton *et al.* detectaram a presença de rotavírus em amostras de biópsias e aspirados duodenais de pacientes com diarreia aguda.

Desde o primeiro achado, o rotavírus recebeu diferentes denominações. Foi chamado de Orbivírus, por sua similaridade a integrantes desse gênero, passou a ser conhecido por Duovírus, pela presença de nítida dupla camada protéica em sua estrutura e por Reovirus-like, pela semelhança com este grupo de vírus. A denominação Rotavírus, foi proposta em 1974 por Flewett *et al.*, em alusão à semelhança de sua morfologia a uma roda (latim: *rota*), quando observada ao microscópio eletrônico. Oficialmente, o gênero Rotavírus, pertencente à família *Reoviridae*, foi definido em 1978, pelo Comitê Internacional de Taxonomia dos Vírus (I.C.T.V. – *International Committee on Taxonomy of Viruses*), durante o 4º Congresso Internacional de Virologia (Matthews, 1979)

No Brasil, o primeiro registro de diarreia aguda associada ao rotavírus se deu em 1975, no Pará, a partir de investigações envolvendo pacientes de um ambulatório pediátrico, nas quais se pode evidenciar a presença do rotavírus por meio da microscopia eletrônica em duas das 13 amostras estudadas (Linhares *et al.*, 1977). Posteriormente, em 1978 na cidade de São Paulo, realizou-se um estudo empregando a técnica de contra imunoeletroforese em 162 amostras de fezes de crianças na faixa de 0 a 12 meses de idade com diarreia aguda. Observou-se a presença do rotavírus em 34 amostras, sendo encontrado com maior frequência nas crianças com idade superior a 6 meses (Candeias *et al.*, 1978).

## 1.2 Características do vírus

Os rotavírus compõem o gênero *Rotavirus*, pertencente à família *Reoviridae*. A partícula viral completa (virion) apresenta diâmetro aproximado de 100 nm, incluindo as

espículas protéicas que se projetam a partir da superfície do vírus. Sua estrutura apresenta simetria icosaédrica não envelopada, composta pelo material genético envolto por três camadas protéicas concêntricas: core, capsídeo interno e capsídeo externo, respectivamente (Figura 1) (Estes e Kapikian, 2007).

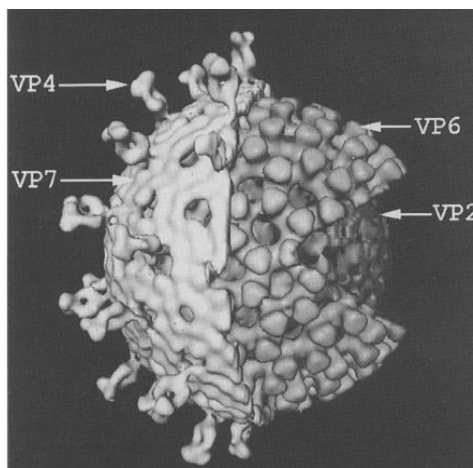


Figura1: Ilustração esquemática das camadas que compõem o virion

Fonte: Patton, 1995.

O genoma viral apresenta 18.550 pares de bases (pb), com peso molecular total variando entre  $0,2 \times 10^6$  e  $2,0 \times 10^6$  Daltons (Da). É constituído por onze segmentos de RNA dupla fita (dsRNA) de polaridade positiva, com pesos moleculares que variam de 663 a 3.302 pb. Com exceção do segmento 11, cada segmento do dsRNA codifica uma proteína diferente, podendo ser estrutural ou não, e por isso são chamados de monocistrônicos. Com isso, teremos a formação de 6 proteínas estruturais, designadas pela abreviatura VP originada do termo em inglês *Viral Protein* e 6 proteínas não estruturais, designadas pela abreviatura NSP originada do termo em inglês *No Structural Protein*. Nos rotavírus, o dsRNA isolado não apresenta infectividade, pois a síntese do RNA mensageiro (mRNA) está associada ao complexo formado entre o dsRNA e às proteínas VP1 e VP3 presentes no core (Figura 2) (Estes e Kapikian, 2007).

O core, camada protéica mais interna da partícula viral, é composto pelas proteínas VP1, VP2 e VP3, codificadas, respectivamente, pelos segmentos 1, 2 e 3 do dsRNA e subdivide-se em duas camadas: camada de VP2 e subcore (Figura 2). A camada de VP2 localiza-se entre o subcore e o capsídeo interno, sendo constituída por uma estrutura icosaédrica composta por 120 moléculas da proteína VP2 arranjadas em

60 dímeros e apresentando diâmetro de 51 nm e espessura de 3,5 nm. O subcore tem diâmetro de 44 nm e é formado pelas proteínas VP1 e VP3, que se associam ao dsRNA. Essa associação origina uma estrutura com 12 complexos enzimáticos, que se liga à superfície interna da camada de VP2 e, entre outras funções, participa da transcrição do mRNA e da replicação viral (Patton *et al*, 1997; Lawton, *et al*, 1997; Estes e Kapikian, 2007).

O capsídeo interno localiza-se entre o core e o capsídeo externo e corresponde a 51% da composição do virion (Figura 2). Sua estrutura apresenta diâmetro de 70,5 nm, sendo formada por 780 moléculas, arranjadas em 260 trímeros da proteína VP6, que é codificada pelo segmento 6 do dsRNA. Pelo fato de compor a maior parte do virion e ser uma camada intermediária que apresenta interação com as outras, acredita-se que o capsídeo interno seja o principal responsável pela integridade estrutural dos rotavírus. Além disso, participa do processo de entrada na célula hospedeira e da transcrição endógena (Pesavento *et al*, 2006; Estes e Kapikian, 2007).

O capsídeo externo, constituído pelas proteínas VP7 e VP4 (Figura 2), apresenta importante papel na infectividade do vírus e caracteriza-se por ser extremamente lábil, sendo sua integridade dependente da presença de íons cálcio. A camada de glicoproteína VP7 representa cerca de 30% da composição do virion, com diâmetro de 75 nm, e constitui a superfície do capsídeo externo através de 780 moléculas arranjadas em 260 trímeros, que se agrupam em pentâmeros ou hexâmeros e interagem com as moléculas de VP6 do capsídeo interno. Essa proteína é codificada pelos segmentos 7, 8 ou 9 do dsRNA, dependendo da cepa estudada e apresenta importante papel na indução da produção de anticorpos neutralizantes (Estes e Cohen, 1989; Prasad e Chiu, 1994; Estes e Kapikian, 2007). A partir da camada de VP7, projetam-se, distribuídas pela superfície viral, 60 espículas constituídas de dímeros da proteína VP4, que é codificada pelo segmento 4 do dsRNA e representa 1,5% da composição protéica total do virion. As espículas medem aproximadamente 20 nm, sendo que 12 nm dessas estruturas são projetados para fora da superfície viral e 8 nm para o interior do capsídeo externo, interagindo com as proteínas VP7, VP6 e possivelmente VP2 (Figura 2). Com isso, as espículas de VP4 têm grande importância na manutenção estrutural da tripla camada protéica e, além disso, apresenta um importante papel na fisiologia viral, associando-se a várias funções como: indução da produção de anticorpos neutralizantes, atividade hemaglutinante, restrição do

crescimento do rotavírus de origem humana *in vitro*, virulência da cepa, processo de penetração celular, fusão entre dois ou mais rotavírus através de um peptídeo presente em sua molécula e ativação da infecciosidade por clivagem proteolítica das espículas de VP4 (Shaw *et al*, 1993; Prasad *et al*, 1994; Both *et al*, 1994; Dormitzer *et al*, 2004). A clivagem proteolítica da VP4 ocorre por ação enzimática, principalmente da tripsina pancreática, gerando duas subunidades protéicas VP8\* e VP5\*. Essas, por sua vez, estão associadas à neutralização homotípica e heterotípica, respectivamente, e são as principais responsáveis pelo desencadeamento do processo de penetração celular (Estes e Kapikian, 2007).

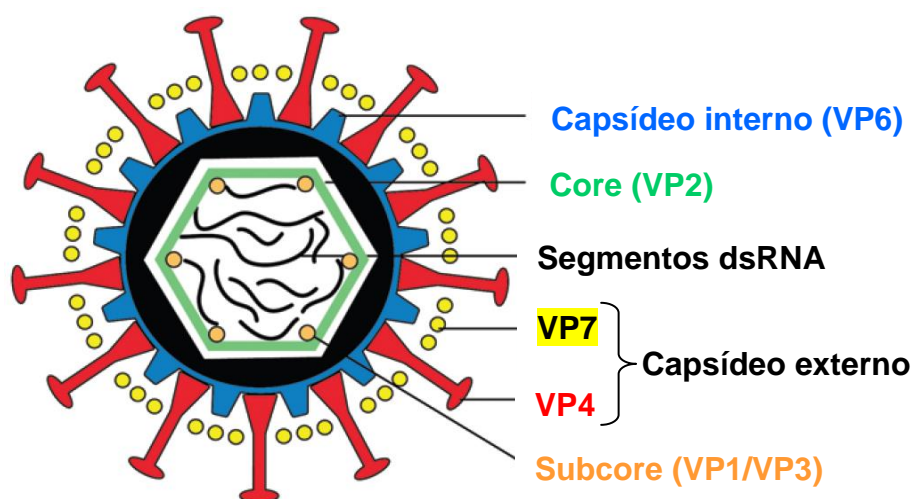


Figura 2: Representação esquemática do virion de Rotavírus

Fonte: Adaptado de Grimwood e Lambert, 2009

As proteínas não estruturais (NSP) do rotavírus são encontradas nas células infectadas e, em geral, estão envolvidas no processo de replicação viral. A NSP1 é codificada através do segmento 5 do dsRNA, apresenta peso molecular de 58 kDa e pode ser encontrada associada ao citoesqueleto da célula hospedeira. É produzida em menor quantidade no início da infecção, apresenta afinidade específica para os 11 segmentos do genoma viral e acredita-se que esteja envolvida na replicação do RNA associada ao pré-core (HUA *et al*, 1994). A NSP2, dependendo da cepa estudada, é codificada pelo segmento 7, 8 ou 9 do dsRNA, apresenta peso molecular de 36 kDa e localiza-se em grande quantidade no viroplasma da célula infectada. Sua atividade de replicase sobre o RNA confere importante papel na replicação viral, assim como, sua associação com a proteína VP1 é fundamental para a formação do viroplasma,



gerando a chamada matriz protéica do viroplasma (Estes e Kapikian, 2007). A NSP3 com peso molecular de 36 kDa é codificada, dependendo da cepa estudada, pelo segmento 7, 8 ou 9 do dsRNA. É encontrada no citoesqueleto da célula infectada, com maior frequência na forma de dímeros e em associação ao core, durante os últimos estágios da montagem das novas partículas virais. Apresenta sítio de ligação específico à extremidade 3' do mRNA, exercendo, dessa forma, importante papel na circulação da molécula pelo citoplasma da célula hospedeira. Através disso, facilita a replicação e a tradução do mRNA através da promoção de seu reconhecimento pela maquinária da célula infectada (Pesavento *et al*, 2006; Estes e Kapikian, 2007). As proteínas NSP5 e NSP6 são codificadas pelo segmento 11 do dsRNA, atuam no viroplasma e apresentam peso molecular de 22kDa e 11kDa, respectivamente. A NSP5, proteína quinase fosforilada, interage com as proteínas NSP2 e NSP6, assim como se liga efetivamente ao RNA para atuar na regulação da síntese de RNA e na formação de partículas incompletas de rotavírus (Estes e Kapikian, 2007). A NSP6 é considerada a menor proteína do rotavírus e sua função está diretamente ligada à interação com a NSP5 (Pesavento *et al*, 2006). Dentre as proteínas não estruturais destaca-se a NSP4, descrita recentemente como a primeira enterotoxina viral e indispensável para a infecção. Essa proteína é codificada pelo segmento 10 do dsRNA, apresenta peso molecular de 20 kDa e é uma glicoproteína transmembrânica associada ao retículo endoplasmático rugoso da célula infectada, que apresenta importante papel na maturação intracelular de algumas partículas virais. Além de sua participação na morfogênese, a NSP4 também é capaz de induzir diarreia secretora através da interação com receptores presentes nas células do epitélio intestinal, sendo elas infectadas ou não pelo rotavírus (Tian *et al*, 1994; Ball *et al*, 1996; Estes e Kapikian, 2007;).

As partículas de rotavírus se apresentam fisicamente estáveis à temperatura de 56°C e a faixa de pH entre 3 a 9. Sua integridade e infectividade são mantidas sob a ação de clorofórmio, éter e fluoro carbono. Podem ser inativadas com o uso de desinfetantes como fenóis, formalina, cloro, betapropalactona e etanol (70 e 95%), sendo este último o mais efetivo, pois atua na remoção do capsídeo externo dos vírions. A utilização da irradiação de luz ultravioleta em partículas de rotavírus mantidas em soluções de tampão fosfato tem apresentado resultado eficaz na inativação total da

infectividade viral (Rodgers *et al*, 1985; Menq *et al*, 1987; Smirnov *et al*, 1991; Estes e Kapikian, 2007).

A classificação do rotavírus em grupos e subgrupos é realizada de acordo com alguns determinantes antigênicos básicos de sua estrutura. O reconhecimento do grupo de cada cepa se dá através da análise sorológica da proteína VP6, podendo classificar o rotavírus em 7 grupos (A, B, C, D, E, F e G), sendo os grupos A, B e C encontrados tanto em seres humanos quanto em animais e os outros grupos encontrados somente em animais. Os rotavírus dos grupos B e C são menos freqüentes e estão associados a surtos em adultos e crianças, sugerindo que estes patógenos sejam emergentes para os seres-humanos (Estes *et al*, 1983; Hung *et al*, 1984; Fang *et al*, 1989; Kuzuya *et al*, 1993; Riepenhoff-Talty *et al*, 1996; Estes e Kapikian, 2007). As cepas do grupo A demonstram elevada prevalência e, conseqüentemente, grande importância epidemiológica em humanos, fazendo com que as mesmas sejam classificadas em subgrupos e caracterizadas por genótipo. A classificação em subgrupos ocorre de acordo com determinantes antigênicos localizados também na proteína VP6, detectados através de ensaios imunoenzimáticos com anticorpos monoclonais específicos. São conhecidos, até o momento, 4 subgrupos: subgrupo I (comum em animais e pouco freqüente em humanos), subgrupo II (pouco freqüente em animais e comum em humanos), subgrupo I/II (pouco freqüente em animais e humanos) e subgrupo não I/não II (pouco freqüente em animais e humanos e comum em aves) (Liprandi *et al*, 1990; Hoshino e Kapkian, 1994).

Com base nas proteínas do capsídeo externo (VP7 e VP4), os rotavírus do grupo A (RVA) podem ser caracterizados de acordo com seus determinantes antigênicos (sorotipo) e pela análise dos genes correspondentes a essas duas proteínas (genótipo). A determinação do sorotipo com base nas duas proteínas citadas é realizada através de testes sorológicos específicos. Ao contrário dos sorotipos da proteína VP7, os sorotipos correspondentes às variações da proteína VP4 não apresentam correlação com os genótipos observados para as variações do gene codificador desta proteína. A caracterização do genótipo das cepas do rotavírus é feita através da análise da seqüência de RNA do gene correspondente às proteínas VP4 e VP7, considerando serem do mesmo genótipo as cepas que apresentarem pelo menos 89% de homologia (Estes e Cohen, 1989; Hoshino e Kapkian, 1994; Estes e Kapikian, 2007). A partir disso, foi estabelecida uma nomenclatura binária para identificação do

genótipo, que é feita utilizando a letra G, correspondendo a VP7 (por ser uma glicoproteína) e a letra P, correspondendo a VP4 (por ser sensível a proteases). Recomenda-se que o genótipo da proteína VP4 seja colocado entre colchetes, para que seja possível diferenciar o genótipo P do sorotipo P, pois este último não utiliza colchetes em sua nomenclatura (Estes e Cohen, 1989; Gorziglia *et al*, 1990). Pela análise do gene correspondente à VP4, encontrou-se a presença, em amostras humanas, de 12 genótipos diferentes (P[1], P[3], P[4], P[6], P[8], P[9], P[10], P[11], P[14], P[19], P[25] e P[28]), enquanto que observando os genes codificadores da VP7, pode-se evidenciar a existência, em humanos, de 12 genótipos distintos (G1, G2, G3, G4, G5, G6, G8, G9, G10, G11, G12 e G20) (Gentsch *et al*, 1996; Hoshino e Kapikian, 2000; Estes e Kapikian, 2007; Matthijnssens *et al*, 2008 e 2011).

### 1.3 Fisiopatologia

A transmissão do rotavírus ocorre pela via fecal-oral ou pela ingestão de água ou alimentos contaminados. Recentemente, tem sido considerada, em menor escala, a transmissão por secreções respiratórias e possivelmente pela via aérea, baseando-se nas seguintes evidências: a rápida aquisição de anticorpos específicos para o rotavírus nos primeiros anos de vida, independente dos hábitos de higiene; a ocorrência de algumas epidemias, em que a transmissão fecal-oral não pode ser evidenciada; a presença de sintomas respiratórios observados em pacientes com gastroenterite causada pelo rotavírus; a detecção do vírus no trato respiratório superior; e a presença de um pico de infecção durante o inverno, nos países de clima temperado (Estes e Kapikian, 2007). A dose mínima para ocorrência da infecção é de 10 vírions, que associada à elevada excreção do rotavírus pelas fezes (aproximadamente 1 trilhão/ml fezes) e a estabilidade do mesmo frente a agentes físicos e químicos, resultam no estabelecimento rápido e efetivo da infecção (Ward *et al*, 1996). Além disso, têm sido observados outros fatores que propiciam a infecção e a transmissão entre indivíduos, como por exemplo: a persistência da infecção em recém nascidos, a alta frequência da infecção nosocomial e a habilidade que o rotavírus tem de sobreviver em superfícies sob diferentes condições. Não há registro da transmissão do rotavírus animal para o homem, porém tem sido observado alto grau de homologia entre o vírus humano e o

animal, possivelmente decorrente da recombinação gênica entre as espécies (Gouvea e Brantly, 1995; Estes e Kapikian, 2007).

Os estudos para entendimento do ciclo de replicação do rotavírus foi inicialmente conduzido através de experimentos com linhagens contínuas de células de rim de macaco e atualmente utilizam-se células polarizadas do epitélio intestinal humano. Os enterócitos diferenciados que integram a superfície das microvilosidades do intestino delgado, principalmente no jejuno, são os sítios de penetração e replicação deste vírus. A infecção evolui no sentido céfalo-caudal, no decorrer de um a dois dias, desde o segmento proximal do intestino delgado até o íleo (Linhares *et al*, 1981; Estes e Kapikian, 2007). Após ultrapassar as barreiras de defesa do trato gastrointestinal e atingir o intestino delgado, o rotavírus inicia o processo de penetração celular, que pode ocorrer de forma direta através da membrana plasmática ou por endocitose decorrente da interação com receptores específicos presentes na superfície celular. Através de estudos com enterócitos polarizados, pode-se observar que a interação do rotavírus com a célula pode ocorrer na membrana apical, através da interação com resíduos de ácido siálico ou na membrana basolateral, onde a ligação ocorre independentemente do ácido siálico. A adsorção da partícula viral pode ser afetada pela variação de temperatura e pH (Estes e Kapikian, 2007).

O processo de penetração celular direta depende de alterações na permeabilidade da membrana plasmática, que ocorre após a clivagem das espículas de VP4 por ação da tripsina pancreática, dando origem às subunidades VP5\* e VP8\*. Acredita-se que as interações entre essas subunidades e as moléculas da superfície celular, sejam as verdadeiras responsáveis pela variação na permeabilidade e consequente penetração viral. O processo de penetração por endocitose ocorre principalmente pela interação da subunidade VP8\* do vírus com moléculas da superfície dos enterócitos. Dentre estas moléculas se destacam: gangliosídeos, glicoproteínas, galactose, ácido siálico e integrinas (Graham e Estes, 1980; Bass *et al*, 1992; Ciarlet e Estes, 1999; Jolly *et al*, 2000; López e Arias, 2004).

Durante o processo de internalização na célula infectada, ocorre a perda do capsídeo externo e a liberação do capsídeo interno, agora com dupla camada protéica, no citoplasma do enterócito hospedeiro. Acredita-se que a redução da concentração de íons  $\text{Ca}^{+2}$  no interior da célula infectada promova alterações conformacionais no capsídeo externo, resultando na solubilização de suas proteínas com consequente

perda da camada de VP4 e VP7. Após o processo de penetração celular, inicia-se a fase de replicação viral, onde os complexos enzimáticos do rotavírus agem em conjunto com a maquinaria celular para a formação de novos vírus. A síntese das proteínas virais ocorre em ribossomos livres, com exceção das proteínas VP7 e NSP4, que são formadas em ribossomos ligados ao retículo endoplasmático rugoso (RER). A maturação final do rotavírus ocorre no RER através da formação do capsídeo externo, onde se observa interação entre as moléculas de VP4, VP7, VP6 e NSP4. O virion formado migra para o citoplasma da célula hospedeira, sendo liberado para infectar outros enterócitos após a lise celular (Estes e Kapikian, 2007).

Estudos histológicos da infecção pelo rotavírus revelam o desenvolvimento das seguintes lesões: atrofia das vilosidades, hiperplasia das criptas e aumento do infiltrado inflamatório da lâmina própria. Nas células absortivas, podemos observar dilatação do retículo endoplasmático, tumefação das mitocôndrias, vacuolização citoplasmática, destruição das microvilosidades e posterior lise celular (Kapikian *et al*, 2001).

A infecção pelo rotavírus pode provocar casos assintomáticos ou sintomáticos, que variam de acordo com a patogenicidade da cepa, a idade, o estado nutricional e a imunidade do hospedeiro. O quadro clínico da infecção se caracteriza pela presença de diarreia, febre e vômito. Dentre estas manifestações, a diarreia ainda constitui o fator de maior gravidade, visto que pode gerar desidratação grave. A infecção sintomática pode ocorrer em qualquer indivíduo, porém se observa com maior frequência na faixa etária de 6 a 24 meses (Linhares e Breese, 2000; Kapikian *et al*, 2001).

O processo diarreico decorrente da infecção pelo rotavírus pode ocorrer por três mecanismos: osmótico, secretor e neuronal. O mecanismo osmótico é caracterizado pelo aumento da osmolaridade no lúmen intestinal decorrente dos danos causados pelo vírus nos enterócitos, que levam à má absorção de carboidratos, eletrólitos e água (Kapikian *et al*, 2001). A diarreia denominada secretora é induzida pela presença de uma enterotoxina viral (NSP4) e, ao contrário da osmótica, ocorre independente da lesão epitelial. Acredita-se que a NSP4 seja eliminada a partir da lise de células infectadas e interaja com receptores superficiais das células não infectadas pelo vírus. Essa interação causa desestabilização da membrana celular e aumento da concentração intracelular de íons cálcio oriundos do retículo endoplasmático, o que leva ao aumento da permeabilidade da membrana plasmática ao cloreto e consequente aumento na secreção de água e íons cloreto para o lúmen intestinal (Ball *et al*, 1996;

Morris *et al*, 1999). Por fim, recentes descobertas demonstram o envolvimento do sistema nervoso autônomo intestinal como efetivo indutor da secreção de líquidos e eletrólitos. Isso ocorre através da produção e liberação de indutores de resposta inflamatória (citocinas, prostaglandinas e óxido nítrico) pelos enterócitos infectados que, em contato com receptores específicos presentes nos neurônios, promovem a despolarização da membrana com conseqüente efluxo de fluídos e eletrólitos para o lúmen intestinal, caracterizando a diarreia do tipo neuronal (Lundgren *et al*, 2000; Lundgren e Svenson, 2003).

## 1.4 Imunidade

Apesar das controvérsias acerca dos efetivos mecanismos determinantes de proteção contra o rotavírus, existem crescentes evidências sobre o papel protetor das imunoglobulinas sistêmicas e locais, assim como sobre a imunidade mediada por células. As proteínas virais VP4 e VP7 são as principais responsáveis pela produção de anticorpos neutralizantes, gerando resposta imune homotípica, específica ao genótipo do vírus responsável pela infecção, ou heterotípica, podendo fornecer proteção contra infecções posteriores causadas por outros genótipos do rotavírus (Estes e Kapikian, 2007). A presença de anticorpos circulantes não confere proteção total contra o agente viral, porém observa-se uma diminuição drástica na gravidade do processo infeccioso (Clemens *et al*, 1993). A imunidade intestinal local, conferida pela imunoglobulina de classe A, apresenta importante papel na resolução do quadro infeccioso, provavelmente pela sua abundância nas secreções e pela resistência frente à degradação proteolítica no trato gastrointestinal. A proteína viral VP6 apresenta importante papel na produção das imunoglobulinas de classe A presentes no intestino delgado (Offit e Clark, 1985; Aiyar *et al*, 1990; Burns *et al*, 1996). Em relação ao processo de imunidade celular, acredita-se que os linfócitos T CD8<sup>+</sup> e CD4<sup>+</sup> participem do processo de eliminação dos vírions da mucosa intestinal (Offit e Dudzik, 1988; Offit, 1996).

## 1.5 Diagnóstico Laboratorial

Apesar do exame clínico fornecer evidências da infecção pelo rotavírus, é fundamental a confirmação da presença do vírus para a conduta terapêutica apropriada, visto que há diversos enteropatógenos com potencial para causar a síndrome diarreica. Com isso, a elevada excreção do rotavírus através das fezes durante a infecção aguda levou ao desenvolvimento de diferentes técnicas para a detecção do vírus, sendo elas baseadas na visualização direta das partículas virais (Microscopia eletrônica direta e Imunomicroscopia eletrônica), na detecção de proteínas estruturais, principalmente VP6, (Ensaio imunoenzimático, Aglutinação em látex e Imunocromatografia) e na detecção do RNA viral (Eletroforese em gel de poliacrilamida e reação de PCR) (Estes e Kapikian, 2007).

A visualização direta do vírus pela microscopia eletrônica ou pela imunomicroscopia eletrônica é considerada como referência para diagnóstico da infecção, porém o alto custo dos equipamentos e a necessidade de um técnico altamente qualificado inviabilizam a utilização em larga escala na rotina dos laboratórios (Estes e Kapikian, 2007).

O ensaio imunoenzimático apresenta alta sensibilidade e especificidade e baseia-se na utilização de anticorpos monoclonais ou policlonais direcionados a proteína VP6 do rotavírus. A facilidade e rapidez na execução dessa metodologia aliadas à produção dos reagentes em alta escala e à possibilidade de testar inúmeras amostras simultaneamente, levou a ampla difusão dessa técnica nos laboratórios (Estes e Kapikian, 2007).

A imunocromatografia também utiliza anticorpos monoclonais específicos à proteína VP6, porém apresenta sensibilidade um pouco inferior ao ensaio imunoenzimático. Apesar disso, o baixo custo, a rapidez e a facilidade de execução dessa técnica, promoveu a ampla utilização no diagnóstico da infecção pelo rotavírus. Com isso, sua utilização não ficou restrita ao laboratório clínico, sendo também utilizada em consultórios pediátricos (Thomas *et al*, 1994; Wilhelme *et al*, 2001; Estes e Kapikian, 2007).

A detecção do RNA viral pela eletroforese em gel de poliacrilamida ou pela reação de PCR apresenta sensibilidade comparável ao ensaio imunoenzimático, além de proporcionar identificação do sorotipo ou genótipo do rotavírus presente na amostra. Essas técnicas são utilizadas com mais frequência em laboratórios de pesquisa, visto

que em comparação com o ensaio imunoenzimático os custos com reagentes e equipamentos são mais elevados (Estes e Kapikian, 2007).

## 1.6 Epidemiologia

A sazonalidade da infecção pelo rotavírus demonstra expressiva diferença entre regiões de clima temperado e aquelas localizadas na faixa tropical. Em países de clima temperado, configura-se um padrão tipicamente sazonal com ocorrência de surtos epidêmicos durante os meses mais frios do ano, enquanto que nas zonas tropicais e subtropicais não existem picos de incidência, observando-se a infecção por este vírus durante todo o ano. Apesar de não estar completamente elucidado, acredita-se que o principal fator para a sazonalidade típica dos países de clima temperado esteja relacionado à baixa umidade relativa do ar característica dos meses de inverno, pois este fato proporciona maior chance de sobrevivência do vírus nas superfícies e consequentemente apresenta maior chance de transmissão. No Brasil, observam-se dois padrões distintos de distribuição da infecção pelo rotavírus ao longo do ano. Nas regiões Sul, Sudeste e Central, os casos de rotavírus ocorrem com maior incidência nos meses mais frios e secos, enquanto que nas demais regiões a infecção apresenta distribuição constante ao longo de todo ano (Cook *et al*, 1990; Linhares, 2000; Estes e Kapikian, 2007).

O RVA é considerado como o principal agente causador da diarreia grave em crianças na faixa de 0 a 5 anos de idade, tanto em países desenvolvidos como naqueles em desenvolvimento. A infecção por este vírus apresenta-se de forma mais grave nas crianças de 6 a 24 meses de vida. Acredita-se que a frequência baixa da infecção pelo rotavírus nos 6 primeiros meses de vida, esteja relacionada à permanência de anticorpos maternos. A grande maioria da população infantil entra em contato com o rotavírus até os 2 anos de idade, sendo que aproximadamente 80% das crianças adquirem anticorpos contra o rotavírus até os 3 anos de idade (Cox, *et al*, 1998; Linhares, 2000; Estes e Kapikian, 2007). A infecção por rotavírus na população adulta é comum, sendo que na maioria dos casos se apresenta na forma assintomática. Um estudo realizado por Kim *et al* (1977), demonstrou que 22 (55%) dos 40 adultos que tiveram contato com crianças internadas por causa do rotavírus, apresentaram evidências da infecção por este vírus, predominantemente na forma



assintomática. Surtos esporádicos relacionados a cepas emergentes podem levar à infecção sintomática nessa população, como observado com o genótipo G9 na Suécia entre os anos de 2001 e 2002 (Rubilar-Abreu *et al*, 2005). Epidemias ou surtos de rotavírus em adultos foram observados ao redor do mundo em pacientes idosos, instituições de reabilitação, recrutas do exército finlandês e funcionários de hospitais (Awachat e Kelkar, 2006; Lijima *et al*, 2006; Estes e Kapikian, 2007). Conforme observado na população idosa da Irlanda em 2006, a infecção por rotavírus nessa faixa etária pode se desenvolver de forma grave, podendo até evoluir a óbito (Feeney *et al*, 2006).

O desenvolvimento da infecção por rotavírus no ambiente hospitalar tem sido relatado com certa frequência. Foi observada uma média de 27% de pacientes, em países desenvolvidos, e 32%, em países em desenvolvimento, que apresentaram sintomas de diarreia causada por rotavírus após serem liberadas do hospital, sendo a infecção adquirida no período em que o paciente estava internado. No ambiente hospitalar, as infecções por rotavírus também têm sido observadas com grande frequência ao redor do mundo, porém a maioria se configura como casos assintomáticos (Gerna *et al*, 1990; Fischer *et al*, 2004; Estes e Kapikian, 2007). A observação do ambiente nosocomial acerca da infecção pelo rotavírus revelou que 10 (17%) de 60 crianças, hospitalizadas por quadro clínico não relacionado à diarreia num período de prevalência do rotavírus, apresentaram desenvolvimento da doença diarreica causada por este vírus. Outra informação importante indica que a cada 5 casos de infecção pelo rotavírus, um foi adquirido no ambiente hospitalar (Estes e Kapikian, 2007).

Anualmente, em escala global, a infecção pelo rotavírus é responsável: por cerca de 100 milhões de casos em crianças menores de 5 anos com quadro clínico de diarreia, que são tratadas em casa; por aproximadamente 20 milhões de casos em crianças que procuram tratamento médico; por volta de 2 milhões de casos em crianças que são hospitalizadas e pelo óbito de mais de 600.000 crianças (Parashar *et al*, 2003).

Em países desenvolvidos, a frequência da infecção é alta, porém a taxa de mortalidade é muito baixa (Parashar *et al*, 2003; Estes e Kapikian, 2007). Nos EUA, a doença pelo rotavírus acomete anualmente 3 milhões de crianças na faixa de 0 a 5 anos de idade, sendo que destas, 55 a 70 mil são hospitalizadas e aproximadamente

de 20 a 40 casos evoluem para o óbito, ocorrendo 1 morte a cada 100 mil casos de infecção pelo rotavírus em crianças menores de 5 anos. Acredita-se que o rotavírus seja o responsável pela diarreia em 5 a 10% dos casos que ocorrem neste país. Estima-se que o custo da infecção por este vírus, nos EUA, seja de aproximadamente 1,5 bilhões de dólares, sendo aproximadamente 400 milhões de dólares gastos com custos médicos diretos e aproximadamente 1 bilhão de dólares gastos em programas sociais (Estes e Kapikian, 2007; Widdowson *et al*, 2007).

Nos países em desenvolvimento, o rotavírus é visto como o principal agente causador da diarreia grave com risco de morte, sendo responsável por aproximadamente 1.200 mortes de crianças menores de 5 anos por dia. Deste total de óbitos, 80% ocorrem na Ásia e África (Parashar *et al*, 2006; Glass *et al*, 2006). Estima-se que na Ásia, África e América Latina, o rotavírus seja responsável por 30 a 60% das hospitalizações de crianças com idade inferior a 5 anos, levando ao óbito por volta de 15 mil crianças na América Latina, aproximadamente 183 mil na África e mais de 230 mil na Ásia. (Estes e Kapikian, 2007). Na América Latina, a infecção pelo rotavírus é responsável por 75 mil casos de diarreia, a taxa de infecção pelo rotavírus entre pacientes ambulatoriais é de 4 a 42% e entre os pacientes internados é de 16 a 52%, sendo que, destes internados, 65 a 85% são crianças no primeiro ano de vida (Kane *et al*, 2004). No Brasil, de 12 a 42% dos quadros de diarreia são relacionados à infecção por rotavírus e aproximadamente 2/3 desses processos ocorrem em crianças na faixa etária de 6 a 24 meses. A gravidade desse quadro diarreico é maior no âmbito ambulatorial e hospitalar do que no comunitário (Linhares, 2000; Kapikian *et al*, 2001).

Nas últimas décadas, a epidemiologia molecular das infecções pelo rotavírus foi bastante explorada, revelando dados cruciais sobre a circulação das cepas ao redor do globo. Em 2005, Santos *et al* publicaram uma revisão que contemplou 124 estudos entre os anos de 1989 e 2004, envolvendo 52 países dos 5 continentes. Com relação aos genótipos referentes à proteína VP7, observou-se que a frequência da infecção pelos genótipos G1, G2, G3 e G4 foi de 97,5% na Ásia, América do Norte e Europa e de 83,5 a 90,4% nos países da América do Sul, África e Austrália, sendo em todos os continentes o genótipo G1, o mais freqüente. O genótipo G9 apareceu na frequência de 4,1% e demonstrou ser o quarto genótipo mais freqüente ao redor do mundo, neste período. Eventualmente, houve relatos dos genótipos G5 e G8, sendo o genótipo G5 mais freqüente na América do Sul e o genótipo G8 mais freqüente nos países do

continente africano. Com relação aos genótipos referentes à proteína VP4, observou-se maior frequência do genótipo P[8], seguido pelo genótipo P[4]. Isso pode ser explicado pelo fato do genótipo P[8] ser associado aos genótipos G1, G3, G4 e G9 e o genótipo P[4] ser associada ao genótipo G2 (Santos e Hoshino, 2005).

No Brasil, Gurgel *et al.* (2008) realizaram estudo de revisão sobre a circulação dos diferentes genótipos do rotavírus no período anterior à inclusão da Rotarix® no calendário básico de vacinas, compreendendo o período de 1986 a 2006. Foi observada, a prevalência de 44% de G1, 19% de G9, 17% de G2, 7% de G3, 5% de G4, 4% de G5 e 1% de G8, G10 e G12. A cepa G1P[8] foi relatada como mais freqüente durante todo este período e apareceu em estudos realizados em todas as regiões do país. O genótipo G9, associado a P[6], P[8] ou P[9], surgiu em território nacional entre 1995 e 2000, somente nas regiões Sudeste e Centro Oeste, sendo observada em todas as regiões após o ano de 2000. Com exceção da região Centro Oeste, a cepa G2P[4] foi observada durante todo o período revisado. A cepa G5P[8] circulou por todas as regiões do Brasil até o ano de 1995, foi observada somente na região Sudeste entre 1995 e 2000 e não foi relatada após este período em nenhuma região. O genótipo G4, associado a P[6] e P[8], foi relatado em todas as regiões até o ano de 1995, circulou somente na região Sudeste entre o período de 1996 a 2000 e foi relatado nas regiões Sudeste, Sul e Centro Oeste após o ano 2000. Os genótipos emergentes G8, G10 e G12 foram relatados somente em algumas regiões após o ano 2000.

Outro estudo de revisão conduzido em território nacional por Leite *et al* (2008), observou a circulação dos genótipos do rotavírus no período entre 1982 a 2007, abrangendo o período pré vacinação e um período aproximado de 1 ano após a introdução da vacina. Até o ano de 2005, as frequências dos genótipos G1, G9, G2, G3, G4 e G5 foram de 43%, 20%, 9%, 6%, 4% e 4%, respectivamente. Neste período anterior à vacinação, foi visto que o genótipo G5 circulou somente entre os anos de 1982 a 1996, o genótipo G9 passou a ser visto após o ano de 1996 e o genótipo G2, que entre 1982 e 1995 apresentava frequência de 26%, decaiu para 2% no período de 1996 a 2005. No período de 2006 a 2007, após a introdução da vacina no calendário básico de vacinação, foram observadas as frequências de 74% do genótipo G2, 11% do genótipo G9, 3% do genótipo G1 e 3% do genótipo G3.

As combinações de genótipos VP7 e VP4 mais frequentes são G1P[8], G2P[4], G3P[8], G4P[8] e G9P[8], porém têm sido frequentemente relatada a ocorrência de combinações G e P não usuais, como por exemplo: G1P[4] / G2P[6] / G3P[6] / G8P[6] / G9P[10] / G10P[14] / G12P[6]. Acredita-se que 5% de todas as infecções pelo rotavírus sejam causadas por cepas com genótipos não usuais, sendo a maioria encontrada em países da América do Sul, África e Ásia (Santos e Hoshino, 2005; Gentsch *et al* 2005; Leite *et al*, 2008). O aparecimento das cepas não usuais pode estar relacionado à recombinação gênica entre cepas de origem humana, a recombinação gênica entre cepas de origem humana e animal ou a transmissão direta de cepas de origem animal para o homem, podendo-se classificar o rotavírus como uma zoonose (Das *et al*, 1994; Bányai *et al*, 2009; Luchs *et al*, 2012). A co-circulação de cepas do rotavírus ocorre com certa frequência e está relacionada à grande diversidade das cepas circulantes. Por conta disso, infecções mistas ocorrem na frequência de 15% nos países da América do Sul, 12% na Ásia, 10% no continente africano, 5% na América do Norte, 2% na Austrália e 1,8% nos países europeus. Como observado, as infecções por mais de uma cepa ocorrem mais frequentemente nos países em desenvolvimento, visto que nestas regiões ocorrem maior diversidade e circulação de cepas incomuns (Santos e Hoshino, 2005; Gentsch *et al* 2005).

Os relatos de cepas emergentes ao redor do mundo são freqüentes, ressaltando a importância dos estudos epidemiológicos para o conhecimento da circulação do vírus e a real importância de cada genótipo na infecção em diferentes regiões do mundo. Neste contexto, há relatos do genótipo G5 no Brasil, Argentina, Paraguai, Camarões, China e Reino Unido; do genótipo G6 na Itália, Austrália, Índia, Bélgica, Hungria e Estados Unidos; do genótipo G8 no continente Africano, na Ásia e na América do Sul; do genótipo G10 no Brasil, Paraguai, Tailândia, Índia e Reino Unido; do genótipo G11 em Bangladesh e na Coreia do Sul e do Genótipo G12 na Ásia, Europa, América do Norte e América do Sul (Santos e Hoshino, 2005; Duan *et al*, 2007).

Os resultados de alguns estudos a respeito da circulação das cepas de rotavírus entre os anos de 2005 a 2010, podem ser observados no quadro 1.

Quadro 1: Relatos de alguns autores a respeito da circulação de cepas de rotavírus.

| Local                  | Período         | Observado  | Referência                         |
|------------------------|-----------------|--|------------------------------------|
| Sergipe                | Nov/06 - Fev/07 | G2P[4] - observado em 100% das amostras  | Gurgel <i>et al</i> , 2007         |
| Sergipe                | Out/06 - Abr/08 | G2P[4] - observado em 95% das amostras   | Gurgel <i>et al</i> , 2009         |
| Recife                 | Mar/06 - Mai/07 | G2 - observado em 100% das amostras  | Nakagomi <i>et al</i> , 2008       |
| Rio de Janeiro         | 2005 - 2007     | G2P[4] - 1,4% (2005) / 44% (2006) / 96% (2007)   | Carvalho-Costa <i>et al</i> , 2009 |
| Parauapebas            | 2006 - 2008     | G2P[4] - observado em 90% das amostras   | Mascarenhas <i>et al</i> , 2010    |
| São Paulo              | 2006 - 2009     | G9P[8] - mais frequente em 2006<br>G2P[4] - mais frequente em 2007/2008/2009                   | Cilli <i>et al</i> , 2011          |
| São Paulo              | 2007 - 2009     | G2P[4] - 62% (2007 - 2009) / único genótipo encontrado em 2007                                 | Carmona, 2010                      |
| São Paulo              | 2006 - 2008     | Em crianças hospitalizadas: G2P[4] - 15% (2006) / 70% (2007) / 100% (2008)                     | Sáfadi <i>et al</i> , 2010         |
| Belém                  | 2008 - 2009     | Em crianças hospitalizadas: Predomínio de G2P[4]   | Justino <i>et al</i> , 2011        |
| Minas Gerais           | 2009 - 2010     | Predomínio de G2P[4]   | Dulgheroff <i>et al</i> , 2012     |
| Curitiba               | 2001 - 2008     | Pacientes hospitalizados: Predomínio de G2P[4] após 2006                                       | Pereira <i>et al</i> , 2013        |
| 18 estados brasileiros | 2005 - 2009     | G9 - mais frequente em 2005 (52%)<br>G2P[4] - 49% (2006) / 66% (2007) / 85% (2008) / 37%(2009) | Carvalho-Costa <i>et al</i> , 2011 |
| Austrália              | 2007 - 2009     | Aumento de G2P[4] nos estados que utilizam a Rotarix®  | Kirkwood <i>et al</i> , 2011       |

## 1.7 Vacinação

No decorrer das últimas 3 décadas, observou-se a repetição de extensas epidemias pelo rotavírus, tanto em países desenvolvidos, como naqueles em desenvolvimento. Com isso, foi possível concluir que eventuais intervenções na saúde pública, como saneamento básico e abastecimento de água potável, têm pouco impacto para o controle da morbidade decorrente das gastroenterites causada por este vírus (Meloni *et al*, 2011; Strina *et al*, 2012). Aliado a esses dados, acredita-se que 20 a 40% das infecções pelo rotavírus são assintomáticas, fato este que contribui efetivamente na propagação do vírus e redução na eficiência das medidas de prevenção. Neste contexto, prevalece o amplo consenso de que o efetivo controle da infecção por rotavírus se condiciona ao desenvolvimento de uma vacina eficaz, para uso corrente no decorrer do primeiro semestre de vida (Linhares e Bresee, 2000; Glass *et al*, 2004; Gleizes *et al*, 2006).

As primeiras candidatas a vacina contra o rotavírus foram produzidas de acordo com os princípios de Edward Jenner e eram constituídas por cepas vivas atenuadas de origem animal. Tal estratégia foi adotada com base no fato de que a maioria das cepas provenientes de humanos e animais apresentavam semelhança no antígeno VP6. Após diversos testes para obtenção de uma vacina eficaz e a avaliação dos resultados obtidos, chegou-se ao consenso de que o imunizante deveria conter amostras virais geneticamente reestruturadas entre cepas de origem animal e humana, com especificidade antigênica para diferentes genótipos. Essa estratégia visa aproveitar o baixo potencial patogênico da cepa de origem animal e sua característica de ser cultivada em linhagens celulares contínuas com a especificidade antigênica oriunda das cepas de origem humana. Com isso, as vacinas desenvolvidas a partir daí continham amostras de rotavírus com dez genes oriundos de cepas de origem bovina ou símia e um gene, correspondente a proteína VP7, de origem humana (Grimwood e Lambert, 2009).

Neste contexto, surgiu a vacina RRV-TV (Rhesus-human reassortant rotavirus tetravalent vaccine), que consiste em uma preparação tetravalente com os genótipos G1, G2, G3 e G4 geneticamente reestruturados entre amostras de origem símia e humana. Tal vacina é realizada, sinteticamente, através do cultivo simultâneo do genótipo G3 (Símio) com os genótipos G1, G2 e G4 (Humano) em substrato celular através de passagens sucessivas, obtendo como resultado uma preparação contendo o genótipo G3, com 11 genes de origem símia e os genótipos G1, G2 e G4 com dez genes de origem símia e um gene de origem humana, correspondente à proteína VP7 (Figura 3). Estudos para avaliação deste imunizante foram conduzidos em 5 países (EUA, Finlândia, Venezuela, Peru e Brasil) com cerca de 15.000 crianças de 1 a 6 meses de vida, resultando na eficácia de aproximadamente 60%, se considerados os episódios diarreicos como um todo, e 80 a 100%, se considerados somente as formas clinicamente mais graves (Lanata *et al*, 1996; Linhares *et al*, 1996; Pérez-Schael *et al*, 1997; Linhares e Bresee, 2000; Dennehy, 2008). Com isso, em agosto de 1998, o “*Food and Drug Administration*”(FDA) licenciou o uso da RRV-TV, sob nome comercial Rotashield™, nos EUA, sendo administrada em crianças híidas sob o regime de três doses: aos dois, quatro e seis meses de idade.

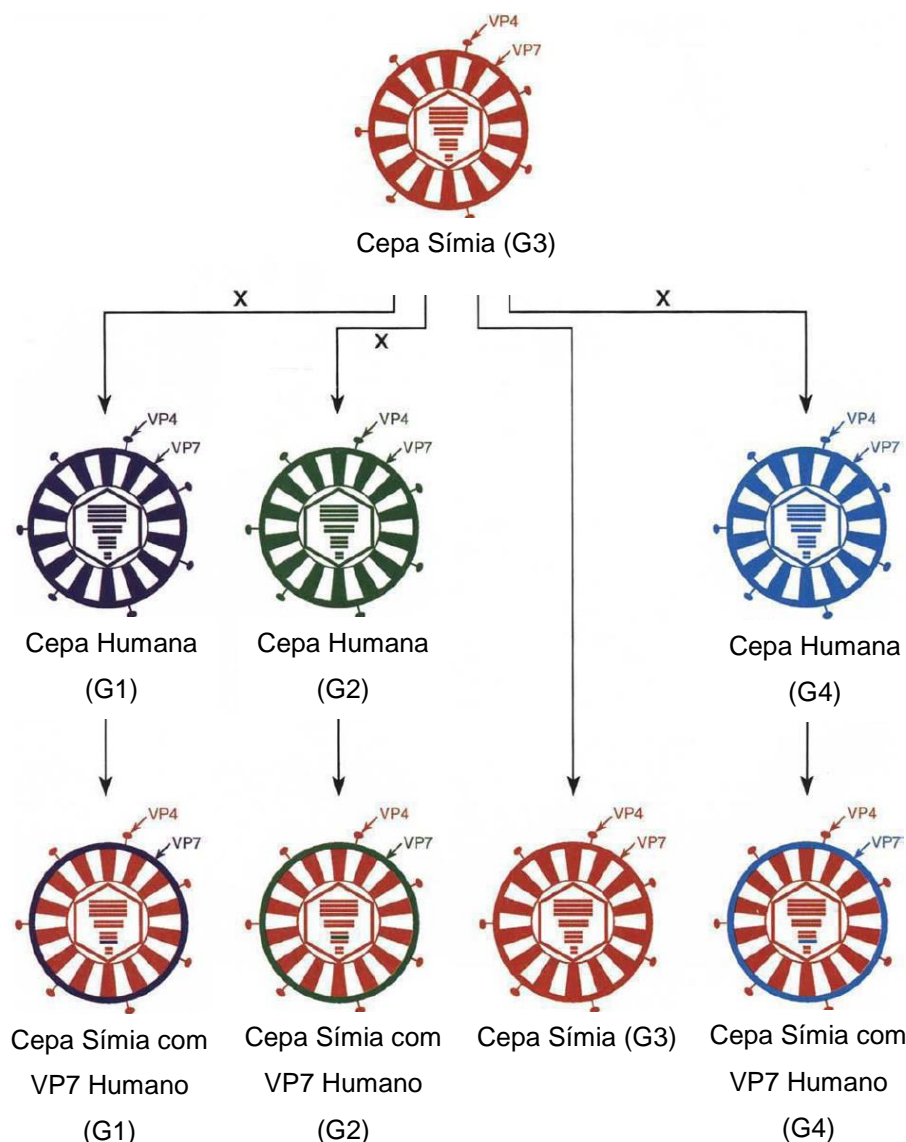


Figura 3: Representação esquemática do rearranjo genético entre cepas de origem humana com cepa de origem símia, que ocorre durante o processo de fabricação da vacina Rotashield™

Fonte: Adaptado de Kapikian *et al*, 1996

Após 11 meses de utilização e 1,5 milhões de doses administradas em aproximadamente 900 mil crianças, o CDC (*Centers for Disease Control and Prevention*), em julho de 1999, recomendou a suspensão do imunizante pela ocorrência de 15 casos de intussuscepção intestinal envolvendo crianças que receberam a vacina (CDC, 1999). Investigações posteriores revelaram a confirmação de 98 casos deste processo obstrutivo intestinal e estudos epidemiológicos subsequentes estimaram que o risco da intussuscepção intestinal seria de 1 a cada 10.000 crianças vacinadas, sendo o período de maior risco entre 3 e 10 dias após a

primeira dose do imunizante. Neste Contexto, em novembro de 1999, o “*Advisory Committe on Immunization Practices*” (ACIP) anulou sua recomendação prévia do uso da Rotashield™ entre crianças norte-americanas, paralelamente à retirada desta vacina do mercado pelo fabricante (Zanardi *et al*, 2001).

Após o incidente com a Rotashield™, diversos estudos com diferentes vacinas foram conduzidos ou estão em andamento. Dentre os imunizantes já licenciados para uso, destacam-se, por sua ampla utilização em diversas áreas do mundo, as vacinas Rotateq® e Rotarix®.

A Rotateq® é uma vacina pentavalente com cepas recombinantes de rotavírus humano e bovino. Apresenta em sua composição 4 cepas com genótipo VP7 humano (G1, G2, G3 e G4) associadas ao genótipo VP4 bovino (P[5]) e 1 cepa com genótipo VP7 bovino (G6) associada ao genótipo VP4 humano (P[8]); dessa forma esse imunizante também leva em consideração a importância da resposta imune contra a proteína VP4, originária do rotavírus humano. A Rotateq® deve ser administrada em 3 doses orais com intervalo de um a dois meses entre uma dose e outra, sendo a primeira dose entre as seis e doze semanas de idade e a última até as 32 semanas de vida (Heaton e Ciarlet, 2007; Hyser e Estes, 2008). Estudos de fase 3 para este imunizante foram conduzidos em onze países diferentes com mais de 70.000 crianças, sendo mais de 80% provenientes dos EUA e Finlândia. No decorrer destes estudos, pode-se evidenciar 6 casos de intussuscepção em crianças que utilizaram o imunizante, em comparação com 5 casos de crianças do grupo controle que não receberam a vacina, concluindo que a Rotateq® não apresenta o risco da intussuscepção. Ainda nestes estudos, o imunizante demonstrou ser 74% eficaz contra todos os casos de diarreia causada pelo rotavírus e 98% eficaz contra os casos mais graves. Com relação à proteção frente a cepas específicas, a Rotateq® demonstrou eficácia de 75% contra o genótipo G1, 63% contra G2, 83% contra G3, 48% contra G4 e 65% contra G9, sendo que este último genótipo não apresentou quantidade suficiente de casos para gerar dados estatisticamente significantes. Perante estes resultados, em fevereiro de 2006, o FDA licenciou a Rotateq® para ser utilizada em crianças norte americanas aos 2, 4 e 6 meses de idade (Hyser e Estes, 2008). No ano de 2008, esta vacina já estava licenciada em 85 países, incluindo países do continente americano, europeu, africano e asiático. Após 19 meses de utilização, nos EUA, com aproximadamente 9 milhões de doses administradas, este imunizante continua sem



apresentar associação com casos de intussuscepção. Estudos posteriores a utilização da Rotateq<sup>®</sup> nos EUA, demonstram queda em 37% na realização de testes laboratoriais para detecção do rotavírus e a positividade destes testes apresentou queda de 79%, em comparação com o período anterior ao licenciamento deste imunizante (Grimwood e Lambert, 2009). Ainda nos EUA, estima-se que a utilização de cuidados médicos decorrentes da infecção pelo rotavírus tenha reduzido em 90% e a ocorrência dessa infecção em crianças vacinadas com a Rotateq<sup>®</sup> reduziu em aproximadamente 45%. Pela primeira vez nos últimos 19 anos não houve relatos de epidemia de rotavírus nos EUA, entre os meses de janeiro e junho de 2010 (Gouveia *et al*, 2011; Patel *et al*, 2011). Dados obtidos por estudos na Finlândia e EUA revelam redução de 59% nas hospitalizações geradas por gastroenterites de qualquer origem, enquanto que estudos conduzidos nos EUA e Europa revelam 96% de redução nas hospitalizações por rotavírus, 94% de diminuição na ida ao pronto socorro e queda de 86% na ida ao consultório (Patel e Parashar, 2009; Tate *et al*, 2011). Estudos conduzidos na Nicarágua revelam que, entre 2007 e 2008, a Rotateq<sup>®</sup> apresentou eficácia de 58% contra diarreia grave causada pelo rotavírus e estima-se que reduziu a mortalidade entre crianças com menos de 5 anos em 73%. Dados obtidos na África e Ásia indicam eficácia de 39,3% e 48,3%, respectivamente, contra diarreia grave nos dois primeiros anos de vida (Giaquinto *et al*, 2011; Goveia *et al*, 2011). Dados epidemiológicos dos EUA e alguns países da Oceania indicam aumento na prevalência do genótipo G3P[8] após a utilização da Rotateq (Patel *et al*, 2011).

A vacina Rotarix<sup>®</sup> faz parte de um grupo de imunizantes que utiliza amostras virais de origem humana atenuada. Tal estratégia se fundamenta na idéia de que infecções naturais repetidas por rotavírus protegem contra subseqüentes exposições, não raro alcançando eficácia clínica de 100%. A Rotarix<sup>®</sup> consiste de uma preparação monovalente da cepa G1P[8] obtida a partir da amostra original 89-12 após clonagens e passagens sucessivas em culturas celulares, a qual se administra pela via oral em duas doses, aos dois e quatro meses de idade. Estudos conduzidos na Finlândia e em 11 países da América Latina com aproximadamente 63.000 crianças, revelam que este imunizante não apresenta risco de causar intussuscepção e demonstrou eficácia de 85% para os casos mais graves da infecção pelo rotavírus. Em relação à proteção frente a genótipos específicos, a Rotarix<sup>®</sup> apresentou eficácia de 92% contra G1P[8], 88% contra G3P[8], G4P[8] ou G9P[8] e 41% contra G2P[4], sendo que para este

último genótipo, os dados obtidos não foram estatisticamente significantes. Na Europa, estudos revelaram 96% de eficácia contra as formas mais graves da infecção pelo rotavírus, proteção de 81% contra a cepa G2P[4] e 72% de redução na hospitalização por gastroenterite de qualquer origem. Perante estes resultados, em 2008, este imunizante já estava licenciado em 100 países, com 25 milhões de doses administradas ao redor do mundo (Dennehy, 2008; Patel e Parashar, 2009; Grimwood e Lambert, 2009; Justino *et al* 2012). Em Israel, a Rotarix<sup>®</sup> apresentou eficácia de 51% na prevenção de gastroenterites de qualquer causa que necessitam de visita médica, eficácia de 90,8% contra a cepa G1P[8] e de 87,3% contra os genótipos G3P[8], G4P[8] e G9[8] (Fay *et al*, 2011). Estudos conduzidos em El Salvador indicam redução de 35 a 48% dos casos de diarreia de qualquer origem, queda de 69 a 81% de hospitalizações decorrentes da infecção pelo rotavírus em crianças com idade inferior a 5 anos e diminuição de 41 a 68%, no ano de 2008, da infecção sintomática pelo rotavírus em crianças maiores de 2 anos que não receberam a vacina (efeito indireto). No México e Panamá, a redução observada nas taxas de hospitalizações por diarreia, de qualquer etiologia, em crianças com idade inferior a 5 anos foi de 11 a 40% e 22 a 37%, respectivamente (Patel *et al*, 2011). Estudos conduzidos em Hong Kong, Taiwan e Cingapura revelam que a Rotarix<sup>®</sup> apresentou eficácia de 100% no primeiro ano de vida contra a diarreia grave causada pelo rotavírus, 94,5% no segundo ano e 100% no terceiro ano. A eficácia contra a hospitalização foi de 94,9% e a proteção frente às diferentes cepas foi de 100% contra G1P[8] e 94% contra os outros genótipos, sendo que neste período somente foi observada a circulação das cepas G1P[8], G3P[8] e G9P[8] (Phua *et al*, 2012).

No Brasil, a Rotarix<sup>®</sup> foi implementada em março de 2006 no calendário vacinal, sendo fornecida pelo governo. Dados oficiais do ministério da saúde revelam que, entre os anos de 2006 a 2012, a cobertura vacinal foi, respectivamente, de 46,5%, 79,8%, 81,2%, 84,4%, 83,0%, 87,1% e 86,4% (Ministério da Saúde - Datasus). Estudos conduzidos após adoção deste imunizante revelam que as hospitalizações decorrentes da infecção pelo rotavírus reduziram em 59% e a queda na mortalidade variou de 22 a 41% (Lopman *et al*, 2012) (Figura 4). Apesar da Rotarix<sup>®</sup> ter se apresentado eficaz contra infecções pelas cepas não-G1P[8], estudos recentes têm demonstrado aumento na frequência e prevalência das cepas G2P[4], no Brasil e na Austrália, e do genótipo G9P[4] no México. Com isso, ampliou-se a discussão em torno dos genótipos

circulantes, assim como a necessidade de estudos relatando a vigilância do rotavírus (Gurgel *et al*, 2007 e 2008; Patel *et al*, 2011; Cilli *et al*, 2011; Carvalho-Costa *et al*, 2011; Lopman *et al*, 2012).

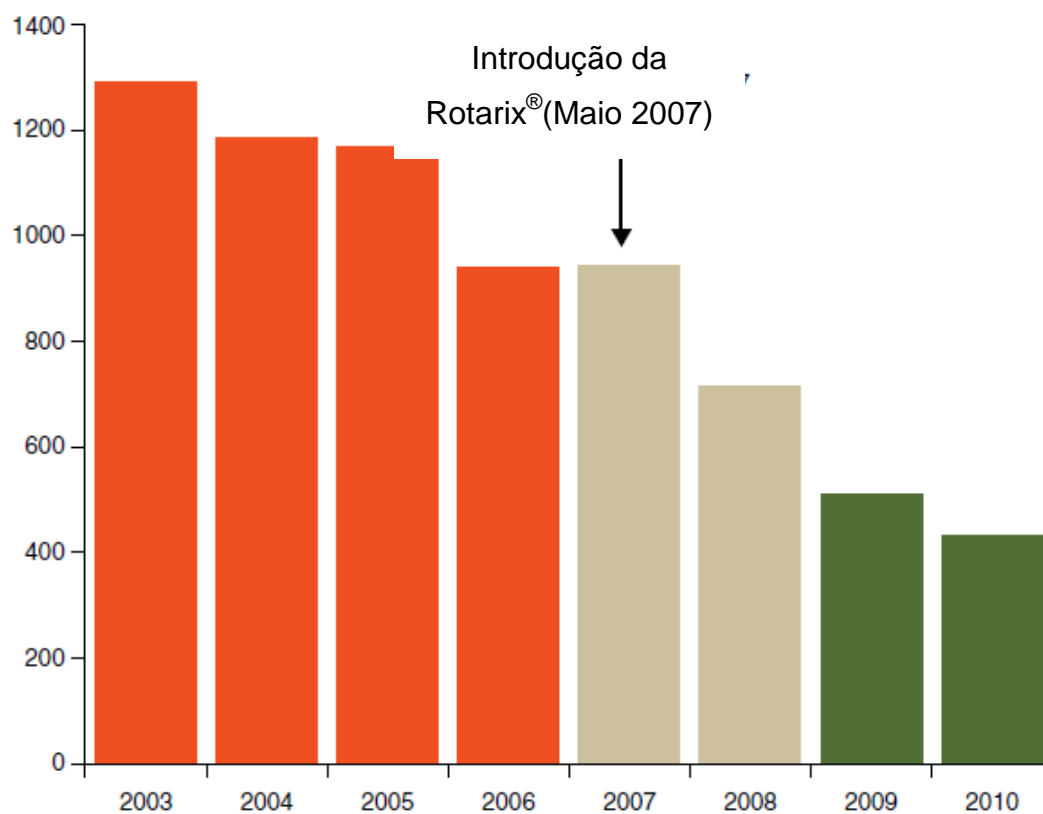


Figura 4: Número de mortes por diarreia, no México, em crianças (0-4 anos) entre os meses de Dezembro e Maio dos anos de 2003 a 2010

Fonte: Adaptado de Lopman *et al*, 2012

## 2- OBJETIVOS

## 2.1 **Objetivo Geral**

Descrever o genótipo das amostras de rotavírus circulantes, em 2 regiões brasileiras, durante o ano de 2009.

## 2.2 **Objetivos específicos**

- Identificar o genótipo das cepas de rotavírus encontradas nos locais estudados, com base nas proteínas do capsídeo externo VP7 (G) e VP4 (P);
- Identificar o genótipo de maior circulação, no ano de 2009, nas regiões brasileiras estudadas (Sudeste e Nordeste);
- Identificar o perfil temporal e demográfico da infecção pelo rotavírus no Brasil, tendo como base as diferentes regiões estudadas;
- Relacionar o perfil genotípico do rotavírus circulante, nas regiões estudadas, com a utilização da vacina Rotarix® no calendário vacinal oficial.

### **3- MATERIAIS E MÉTODOS**

O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de São Paulo / Hospital São Paulo e pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Instituto Fleury.

### **3.1 Amostras de fezes**

As amostras utilizadas neste estudo foram coletadas no decorrer do ano de 2009, em estados pertencentes a duas regiões geográficas brasileiras: Sudeste (SP e RJ) e Nordeste (BA e PE), de pacientes que procuraram os laboratórios do Grupo Fleury S/A e que, por solicitação médica, compareceram aos laboratórios para realização da pesquisa de rotavírus em fezes. As amostras em questão foram coletadas com o objetivo único de prestar o serviço solicitado ao paciente do laboratório. Em seu curso normal, as mesmas seriam descartadas em esgoto após aproximadamente 3 dias da realização dos exames necessários. As amostras ficaram à temperatura ambiente ou sob refrigeração (4 a 8°C), do momento da coleta até a realização da pesquisa de rotavírus, sendo, após este período, mantidas sob refrigeração (4 a 8°C) por 3 dias para eventuais testes confirmatórios. Depois disso, foram encaminhadas em caixa de isopor com presença de Gelox (4 a 8°C) para serem utilizadas neste projeto com tempo estimado de transporte de 1 a 2 dias, dependendo da localidade do laboratório de origem. Depois de serem recebidas, as amostras foram congeladas a -20°C e posteriormente, de acordo com a disponibilidade no freezer, transferidas para temperatura de -70°C até o momento de sua utilização.

Para caracterização epidemiológica das amostras foi coletado, através do sistema informatizado do Grupo Fleury S/A, os dados referentes à idade, sexo e histórico de vacinação contra rotavírus de cada paciente que teve sua amostra utilizada neste estudo. Após a coleta dos dados utilizados de cada amostra, foi possível realizar a “desidentificação” dos indivíduos que tiveram suas amostras utilizadas. Para isso, cada amostra foi nomeada através de um número e a identificação do paciente foi desprezada, impossibilitando a correlação da amostra com o respectivo indivíduo. Com a “desidentificação”, não foi possível evidenciar a presença ou ausência de duas ou mais amostras coletadas em datas diferentes, relacionadas a um único paciente.

Todos os procedimentos práticos deste estudo foram realizados no laboratório do Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento (IPD) do Grupo Fleury S/A, localizado na cidade de São Paulo.

### **3.2 Pesquisa de rotavírus**

Na rotina dos laboratórios do Grupo Fleury S/A, a pesquisa de rotavírus em fezes foi realizada através da técnica de imunocromatografia pelo kit Vikia<sup>®</sup> Rota-Adeno (bioMérieux<sup>®</sup> sa). Este teste é qualitativo e se baseia na ligação de anticorpos monoclonais anti-rotavírus com a proteína VP6 da partícula viral. A positividade da reação ocorre através da presença de microesferas de poliestireno de cor azul ligadas aos anticorpos monoclonais, que tornam a ligação do anticorpo com a proteína VP6 visível através da formação de uma linha de cor azul.

### **3.3 Dados sobre vacinação**

Para os pacientes com idade entre 0 e 4 anos, que poderiam ter tomado a vacina Rotarix<sup>®</sup> após sua implementação no calendário vacinal em 2006, houve o questionamento de seus responsáveis, através de uma pergunta técnica no sistema informatizado de abertura de fichas, sobre a imunidade contra o rotavírus através desta vacina. O ato de fazer uma pergunta técnica ao paciente faz parte da rotina normal do atendimento ao cliente e ocorre no momento da abertura da ficha. Esse procedimento, já existente, é aplicado com o intuito de coletar todas as informações do paciente relevantes à interpretação dos resultados de cada exame solicitado e de confeccionar um laudo objetivo e de fácil interpretação para o médico do paciente.

### **3.4 Preparo da suspensão de fezes**

As amostras de fezes foram retiradas do freezer -70°C e mantidas por algumas horas na temperatura de 4 a 8°C para descongelamento. Após isso, foi preparada uma suspensão de fezes a 10% em PBS (Fosfato de sódio a 10 mmol/L e Cloreto de sódio a 0,15 mol/L em pH de 7,2 a 7,4). Essa suspensão foi devidamente homogeneizada e centrifugada a 3.500 rpm por 30 minutos. A partir disso, o sobrenadante foi separado e



congelado novamente à -20°C até o momento de sua utilização (Li *et al*, 2008). Para as amostras que apesar da centrifugação, não foi possível separar as partículas sólidas do sobrenadante, foi feita a filtragem da amostra com auxílio de um filtro de 0,22 µm e uma seringa de 5 mL.

### 3.5 Amostras padrão

Para padronização das metodologias moleculares empregadas neste estudo, foram utilizadas amostras de RNA e cDNA positivas para rotavírus com genótipo conhecido. Essas amostras foram gentilmente cedidas pelo Núcleo de Doenças Entéricas, Centro de Virologia do Instituto Adolfo Lutz. As amostras padrão de cDNA foram utilizadas para testar o protocolo da 2ª PCR para as proteínas VP7 e VP4, enquanto que as amostras padrão de RNA foram úteis para padronização do procedimento de extração do RNA viral em amostras de fezes e o produto desta extração foi utilizado para o teste da 1ª PCR, para as proteínas VP7 e VP4.

### 3.6 Extração do RNA viral

A partir do sobrenadante da suspensão de fezes em PBS, foi realizado o procedimento de extração do material genético (dsRNA) do rotavírus presente em cada amostra. Esse procedimento foi inicialmente padronizado com o kit de extração manual QIAamp® Viral RNA Mini (QIAGEN) (Li *et al*, 2008) e posteriormente padronizado com a extração automatizada através do equipamento QIAasympphony (QIAGEN) utilizando o kit QIAasympphony® Vírus/Bactéria Mini (QIAGEN). As duas padronizações obtiveram resultados satisfatórios e equivalentes, sendo possível a utilização de qualquer um dos métodos para esta etapa do projeto.

#### 3.6.1 Extração manual (QIAamp® Viral RNA Mini)

O método de extração proposto neste kit baseia-se na ligação do RNA a uma membrana de sílica gel, facilitada pela ação de alguns reagentes com propriedades químicas específicas para este fim. A partir disso são realizadas algumas lavagens para eliminar as moléculas indesejadas presentes na amostra e por fim utiliza-se um

reagente que promove o desligamento entre o RNA e a membrana, gerando o produto da extração com a presença do RNA viral. Antes do início da extração, foi preciso preparar os reagentes fornecidos pelo kit de acordo com as especificações da bula.

Em um microtubo com capacidade para 1,5 mL foram adicionados 140 µL da amostra (sobrenadante obtido a partir da suspensão da amostra em PBS) a 560 µL do Tampão AVL. Essa mistura foi agitada e incubada por 10 minutos à temperatura ambiente. Após isso, foi adicionado 560 µL de Etanol (96 a 100%), a mistura foi homogeneizada e centrifugada rapidamente para evitar perda da mistura na tampa do microtubo. Depois deste procedimento, foi aplicado 630 µL desta mistura na coluna onde a membrana está presente e centrifugado a 8000 rpm por 1 minuto, para que a mistura passe através da membrana e somente as moléculas de RNA fiquem “presas” à ela. Após a centrifugação, a mistura que passou pela membrana foi desprezada e repetiram-se os últimos passos até que toda a amostra tenha sido filtrada na membrana. Depois disso, foi adicionado 500 µL do tampão AW1 à coluna, centrifugado a 8000 rpm por 1 minuto e novamente desprezado o líquido filtrado. A seguir, foi adicionado 500 µL do tampão AW2, centrifugado a 14000 rpm por 3 minutos, desprezado o líquido filtrado e centrifugado mais uma vez na mesma velocidade por 1 minuto, para garantir que todo o tampão AW2 tenha sido filtrado e desprezado. Após desprezo do líquido filtrado nesta última centrifugação, foram adicionados, na coluna, 60 µL do tampão AVE, contendo “carrier” RNA. Incubou-se por 1 minuto à temperatura ambiente e, por fim, foi centrifugado por 1 minuto a 8000 rpm. O líquido obtido através dessa última centrifugação corresponde ao produto final da extração com a presença do RNA e foi armazenado à temperatura de -70 °C até o momento de sua utilização na reação de PCR.

### **3.6.2 Extração automatizada (QIAasympny® Vírus/Bactéria Mini)**

O método de extração proposto neste kit baseia-se na ligação do RNA viral a partículas magnéticas, facilitada pela ação de reagentes específicos para este fim. Este procedimento ocorre através de 4 passos distintos:

- Lise da amostra para “exposição” do material genético;
- Ligação do RNA viral às partículas magnéticas;

- Lavagens para eliminar moléculas indesejadas presentes nas partículas magnéticas;
- Eluição do RNA viral através de um reagente específico (AVE) que promove o desligamento entre as moléculas de RNA e as partículas magnéticas.

Antes de iniciar a extração, foi preciso preparar alguns reagentes fornecidos pelo kit de acordo com as especificações da bula e homogeneizar bem o frasco com as partículas magnéticas. Para isso, o frasco foi retirado do cartucho de reagentes, homogeneizado e recolocado novamente no cartucho. Depois de ligar o equipamento QIAasympny, foi preciso abastecê-lo com os materiais consumíveis e o cartucho dos reagentes. Com as amostras, à temperatura ambiente, carregadas no equipamento, foi selecionado o protocolo do ensaio (Cellfree complex 200 DSP default IC), pressionado o botão “Run” e aguardado até o término da extração, que para cada 24 amostras demora aproximadamente uma hora e vinte minutos. Ao término do procedimento, a amostra de RNA viral extraída, num volume final de 60 µL, foi retirada do equipamento e armazenada à temperatura de 70°C negativos até o momento de sua utilização na reação de PCR.

### 3.7 Realização da 1ª PCR (RT-PCR)

O procedimento de RT-PCR foi realizado a partir da amostra de dsRNA extraído da suspensão fecal e tem como objetivo a formação e amplificação de cDNA correspondente aos genes das proteínas VP7 e VP4 do rotavírus extraído (Figura 5).

#### 3.7.1 *Primers* utilizados

Para realização da RT-PCR, foram utilizados *primers* específicos e complementares aos genes que codificam as proteínas VP7 e VP4, de modo que os dois genes em questão fossem amplificados completamente (Quadro 2).

Esses *primers* foram adquiridos na forma liofilizada e ressuspensos em água ultra pura livre de RNase e DNase (Invitrogen), obtendo uma solução estoque na concentração de 100 µM para cada primer. A partir dessas soluções, foi preparado um *pool* de *primers* correspondente à VP7 (BEG/END) e outro correspondente à VP4 (CON3/CON2), onde cada primer se apresenta na concentração de 20 µM.

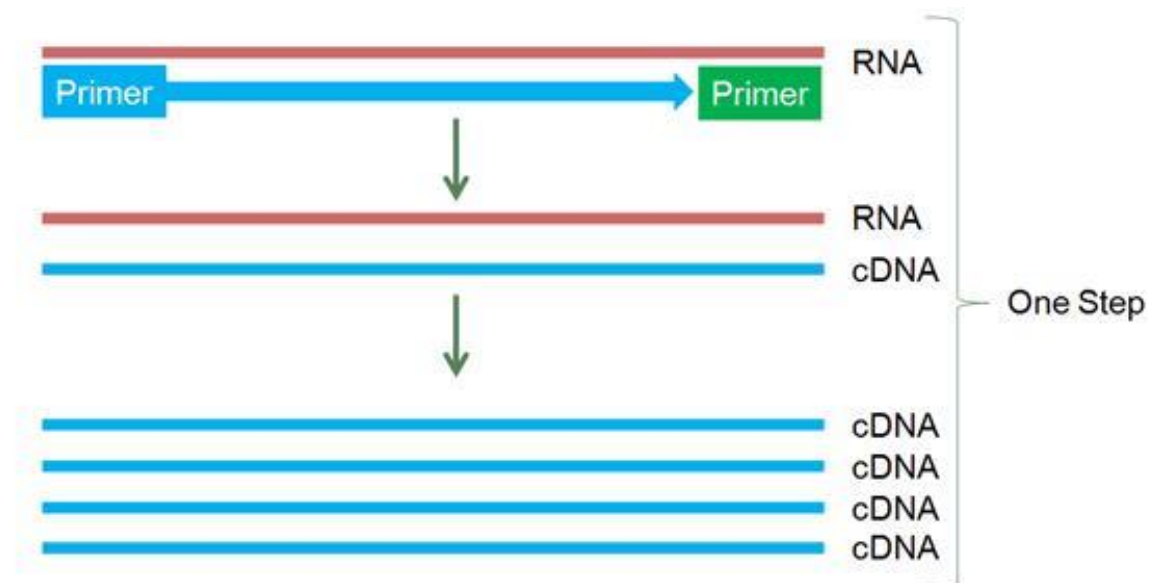


Figura 5: Esquemática da formação e amplificação do cDNA ocorridas na reação de 1º PCR a partir do RNA extraído.

Quadro 2: *Primers*, correspondentes à VP7 e VP4, utilizados na 1ª PCR (RT-PCR)

|     | Primer | Sequência (5' - 3')          | Posição     | Cepa | Polaridade | Tamanho do segmento | Referência                   |
|-----|--------|------------------------------|-------------|------|------------|---------------------|------------------------------|
| VP7 | BEG    | GGCTTTAAAAGAGAGAATTTCCGTCTGG | 1 - 28      | Wa   | PLUS       | 1062 bp             | Gouvea <i>et al.</i> , 1990  |
|     | END    | GGTCACATCATACAATTCTAATCTAAG  | 1062 - 1036 | SA11 | MINUS      |                     | Gouvea <i>et al.</i> , 1990  |
| VP4 | CON3   | TGGCTTCGCCATTTTATAGACA       | 11 - 32     | KU   | PLUS       | 876 bp              | Gentsch <i>et al.</i> , 1992 |
|     | CON2   | ATTCGGACCATTATAACC           | 887-868     | KU   | MINUS      |                     | Gentsch <i>et al.</i> , 1992 |

### 3.7.2 1ª PCR (VP7 e VP4)

As reações da 1ª PCR para a proteína VP7 (gene 9) foram realizadas em um microtubo diferente das reações correspondente à proteína VP4 (gene 4). Com exceção do *pool* de *primers* que são específicos ao gene de cada proteína, os reagentes utilizados e as condições da reação foram iguais para a RT-PCR para as duas regiões gênicas. Em um microtubo com capacidade para 200 µL, foram misturados 3 µL de Dimetilsufóxido (DMSO) a 5 µL do dsRNA extraído. Essa mistura foi aquecida à 93°C por 3 minutos e imediatamente resfriada em banho de gelo por no mínimo 5 minutos. Após o tempo de resfriamento, foram adicionados 42 µL da seguinte mistura: 14,2 µL de água destilada ultra pura livre de DNase e RNase (Invitrogen), 16 µL da mistura de dioxinucleotídeos trifosfato (contendo dATP, dGTP, dCTP e dTTP, todos na concentração de 1,25 mM), 5 µL do tampão de reação 10 vezes concentrado (contendo 200 mM de Tris-HCl em pH 8,4 e 500 mM de KCl – Tampão presente no kit

da enzima Taq DNA Polimerase Platinum), 5 µL da solução de Cloreto de Magnésio (50 mM – Solução presente no kit da enzima Taq DNA Polimerase Platinum), 1 µL do *pool* de *primers* (contendo 20 µM de cada primer) para VP7 ou para VP4, 0,4 µL da enzima Taq DNA polimerase Platinum (Invitrogen) e 0,4 µL da enzima Transcriptase Reversa (Superscript II – Invitrogen) (Quadro 3). Após isso, os microtubos correspondentes às reações para as regiões gênicas VP7 e VP4 foram colocados no termociclador (Veriti® 384-well Thermal Cycler – Applied Biosystems®) com a seguinte programação: 42°C por 60 minutos (procedimento de transcrição reversa para formação de cDNA), 35 ciclos de 94°C por 1 minuto, 42°C por 2 minutos e 72°C por 1 minuto (para amplificação do cDNA formado na etapa anterior) e por fim 72°C por 5 minutos (para promover extensão das fitas de cDNA formadas) (Quadro 4). Para todas as reações da 1ª PCR realizadas, foram utilizados controles negativo (água destilada ultra pura) e positivo (amostra de rotavírus previamente genotipada).

Quadro 3: Quantidade de reagentes utilizados na reação do 1º PCR para as proteínas VP7 e VP4.

| Nº Amostra | H <sub>2</sub> O ultra pura | mix dNTPs | Tampão 10x (Taq DNA polimerase) | MgCl <sub>2</sub> | Pool Primers (20mM) | Taq DNA Polimerase | Transcriptase reversa |
|------------|-----------------------------|-----------|---------------------------------|-------------------|---------------------|--------------------|-----------------------|
| 1          | 14,2 µL                     | 16 µL     | 5 µL                            | 5 µL              | 1 µL                | 0,4 µL             | 0,4 µL                |

Quadro 4: Programação utilizada no termociclador para a reação do 1º PCR para VP7 e VP4.

|                   |           |                  |                  |
|-------------------|-----------|------------------|------------------|
| 42°C - 60 minutos | 35 ciclos | 94°C - 1 minuto  | 72°C - 5 minutos |
|                   |           | 42°C - 2 minutos |                  |
|                   |           | 72° - 1 minuto   |                  |

### 3.8 Realização da 2ª PCR (Semi-nested)

A PCR Semi-nested foi realizado a partir do produto da RT-PCR (cDNA formado) e tem como objetivo a formação e amplificação da porção do DNA correspondente somente ao(s) genótipo(s) das proteínas VP7 e VP4 presentes nas amostras estudadas (Figura 6).

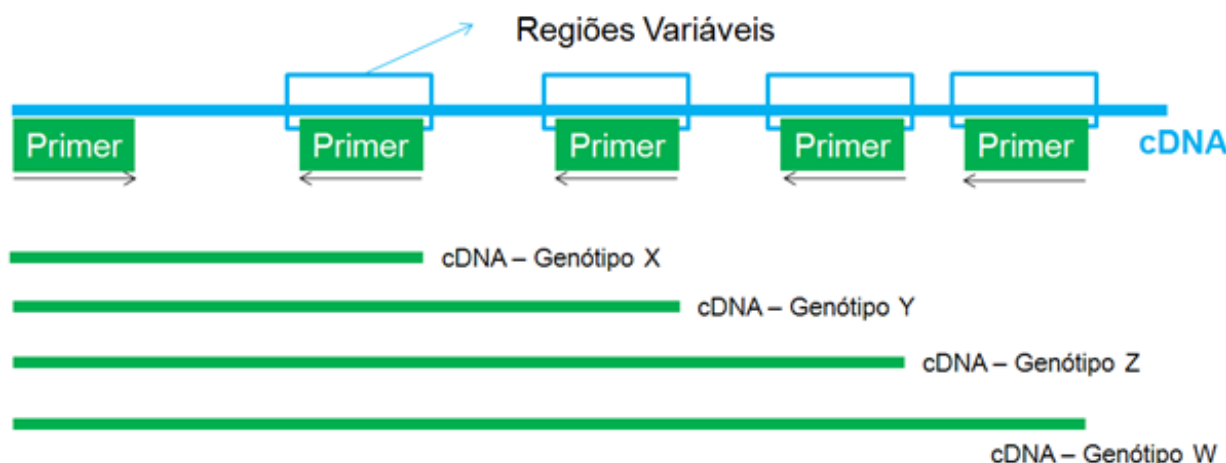


Figura 6: Esquematização da formação do cDNA, referente ao genótipo de rotavírus presente na amostra, ocorrida na reação de 2º PCR a partir do cDNA formado no 1º PCR.

### 3.8.1 *Primers* utilizados

Para realização da PCR Semi-nested, foram utilizados *primers* específicos para diferentes genótipos das proteínas VP7 e VP4, de modo que ocorra a formação e amplificação da(s) fita(s) de DNA correspondente(s) somente ao(s) genótipo(s) do rotavírus presente(s) nas amostras analisadas (Quadro 5).

Esses *primers* foram adquiridos na forma liofilizada e ressuspensos em água ultra pura livre de RNase e DNase (Invitrogen), obtendo uma solução estoque na concentração de 100 µM para cada primer. A partir dessas soluções, foi preparado um *pool* de *primers* correspondente à VP7 (9CON1 / 9T1-1 / 9T1-2 / 9T-3P / 9T-4 / FT5 / 9T-9B), com cada primer na concentração de 10mM e outro *pool* correspondente à VP4 (CON3 / 2T-1 / 3T-1 / 1T-1 / 4T-1), com cada primer na concentração de 20 µM.

### 3.8.2 2ª PCR para proteína VP7

Em um microtubo com capacidade para 200 µL, foi misturado 1 µL do produto obtido na reação da 1ª PCR, correspondente ao gene da proteína VP7, a 24 µL da seguinte mistura: 9,8µL de água destilada ultra pura livre de DNase e RNase (Invitrogen), 8µL da mistura de dioxinucleotídeos trifosfato (contendo dATP, dGTP, dCTP e dTTP, todos na concentração de 1,25 mM), 2,5µL do tampão de reação 10 vezes concentrado (contendo 200 mM de Tris-HCl em pH 8,4 e 500 mM de KCl – Tampão presente no kit da enzima Taq DNA Polimerase Platinum), 2,5 µL da solução

de Cloreto de Magnésio (50 mM – Solução presente no kit da enzima Taq DNA Polimerase Platinum), 1 µL do *pool* de *primers* específicos à 2ª PCR para VP7 (contendo 10 µM de cada primer) e 0,2µL da enzima Taq DNA polimerase Platinum (Invitrogen) (Quadro 6). Após isso, os microtubos foram colocados no termociclador (Veriti® 384-well Thermal Cycler – Applied Biosystems®) com a seguinte programação: 25 ciclos de 94°C por 1 minuto, 50°C por 2 minutos e 72°C por 1 minuto (para promover a formação e amplificação de fitas de DNA somente da região correspondente ao genótipo VP7 presente em cada amostra, de acordo com os *primers* escolhidos) e por fim 72°C por 5 minutos (para promover extensão das fitas de DNA formadas) (Quadro 8). Para todas as reações da 2ª PCR para VP7, foram utilizados controles negativo (água destilada ultra pura) e positivo (amostra de rotavírus genotipada), processados previamente na 1ª PCR para VP7.

Quadro 5: *Primers*, correspondentes às proteínas VP7 e VP4, utilizados na 2ª PCR (Semi-nested)

|     | Primer | Sequência (5' - 3')    | Posição   | Cepa   | Polaridade | Tamanho do segmento | Genótipo | Referência          |
|-----|--------|------------------------|-----------|--------|------------|---------------------|----------|---------------------|
| VP7 | 9CON1  | TAGCTCCTTTTAATGTATGG   | 37 - 56   | WA     | PLUS       | -                   | -        | Das et al, 1994     |
|     | 9T1-1  | TCTTGTCAAAGCAAATAATG   | 195 - 176 | WA     | MINUS      | 158 bp              | G1       | Das et al, 1994     |
|     | 9T1-2  | GTTAGAAATGATTCTCCACT   | 281 - 262 | S2     | MINUS      | 244 bp              | G2       | Das et al, 1994     |
|     | 9T-3P  | GTCCAGTTGCAGTGTTAGC    | 503 - 484 | 107E1B | MINUS      | 466 bp              | G3       | Das et al, 1994     |
|     | 9T-4   | GGGTCGATGGAAAATTCT     | 440 - 423 | ST3    | MINUS      | 403 bp              | G4       | Das et al, 1994     |
|     | FT5    | CATGTACTCGTTGTTACGTC   | 760 - 779 | OSU    | MINUS      | 723 bp              | G5       | Gouvea et al, 1994  |
|     | 9T-9B  | TATAAAGTCCATTGCAC      | 147 - 131 | 116E   | MINUS      | 110 bp              | G9       | Das et al, 1994     |
| VP4 | CON3   | TGGCTTCGCCATTTTATAGACA | 11 - 32   | KU     | PLUS       | -                   | -        | Gentsch et al, 1992 |
|     | 2T-1   | CTATTGTTAGAGGTTAGAGTC  | 484 - 474 | RV5    | MINUS      | 483 bp              | P[4]     | Gentsch et al, 1992 |
|     | 3T-1   | TGTTGATTAGTTGGATTCAA   | 278 - 259 | 1076   | MINUS      | 267 bp              | P[6]     | Gentsch et al, 1992 |
|     | 1T-1   | TCTACTTGGATAACGTGC     | 356 - 339 | KU     | MINUS      | 345 bp              | P[8]     | Gentsch et al, 1992 |
|     | 4T-1   | TGAGACATGCAATTGGAC     | 402 - 385 | K8     | MINUS      | 391 bp              | P[9]     | Gentsch et al, 1992 |

Quadro 6: Quantidade de reagentes utilizados na reação do 2º PCR para a proteína VP7.

| Nº Amostra | H <sub>2</sub> O ultra pura | mix dNTPs | Tampão 10x (Taq DNA polimerase) | MgCl <sub>2</sub> | Pool Primers (10 mM) | Taq DNA Polimerase |
|------------|-----------------------------|-----------|---------------------------------|-------------------|----------------------|--------------------|
| 1          | 9,8 µL                      | 8 µL      | 2,5 µL                          | 2,5 µL            | 1 µL                 | 0,2 µL             |

### 3.8.3 2ª PCR para proteína VP4

Em um microtubo com capacidade para 200 µL, foi misturado 1 µL do produto obtido na reação da 1ª PCR, correspondente ao gene da proteína VP4, a 24 µL da

seguinte mistura: 10,3 µL de água destilada ultra pura livre de DNase e RNase (Invitrogen), 8 µL da mistura de dioxinucleotídeos trifosfato (contendo dATP, dGTP, dCTP e dTTP, todos na concentração de 1,25 mM), 2,5 µL do tampão de reação 10 vezes concentrado (contendo 200 mM de Tris-HCl em pH 8,4 e 500 mM de KCl – Tampão presente no kit da enzima Taq DNA Polimerase Platinum), 2,5 µL da solução de Cloreto de Magnésio (50 mM – Solução presente no kit da enzima Taq DNA Polimerase Platinum), 0,5 µL do *pool* de *primers* específicos à 2ª PCR para VP4 (contendo 20 µM de cada primer) e 0,2 µL da enzima Taq DNA polimerase Platinum (Invitrogen) (Quadro 7). Após isso, os microtubos foram colocados no termociclador (Veriti® 384-well Thermal Cycler – Applied Biosystems®) com a seguinte programação: 25 ciclos de 94°C por 1 minuto, 50°C por 2 minutos e 72°C por 1 minuto (para promover a formação e amplificação de fitas de DNA somente da região correspondente ao genótipo VP4 presente em cada amostra, de acordo com os *primers* escolhidos) e por fim 72°C por 5 minutos (para promover extensão das fitas de DNA formadas) (Quadro 8). Para todas as reações da 2ª PCR para VP4, foram utilizados controles negativo (água destilada ultra pura) e positivo (amostra de rotavírus genotipada), processados previamente na 1ª PCR para VP4.

Quadro 7: Quantidade de reagentes utilizados na reação do 2º PCR para a proteína VP4.

| Nº Amostra | H <sub>2</sub> O ultra pura | mix dNTPs | Tampão 10x (Taq DNA polimerase) | MgCl <sub>2</sub> | Pool Primers (20mM) | Taq DNA Polimerase |
|------------|-----------------------------|-----------|---------------------------------|-------------------|---------------------|--------------------|
| 1          | 10,3 µL                     | 8 µL      | 2,5 µL                          | 2,5 µL            | 0,5 µL              | 0,2 µL             |

Quadro 8: Programação utilizada no termociclador para a reação do 2º PCR para VP7 e VP4.

|           |                  |                  |
|-----------|------------------|------------------|
| 25 ciclos | 94°C - 1 minuto  | 72°C - 5 minutos |
|           | 50°C - 2 minutos |                  |
|           | 72° - 1 minuto   |                  |

### 3.9 Eletroforese em gel de agarose

A eletroforese em gel de agarose foi realizada com o intuito de verificar o resultado obtido após as reações de PCR e genotipar a cepa do rotavírus presente em cada amostra. Este procedimento, realizado com o produto obtido das reações da 1ª PCR (RT-PCR) para VP7 e VP4, teve a finalidade de constatar a amplificação do



material genético correspondente ao gene de VP7 e VP4, enquanto que a eletroforese realizada com o produto da reação da 2ª PCR (Semi-nested) teve a finalidade de identificar o genótipo de VP7 e VP4 presente em cada amostra. A constatação da amplificação dos genes estudados e a identificação do genótipo correspondente foram realizadas a partir da verificação do tamanho de cada sequência de DNA obtido, utilizando como base as bandas com tamanhos previamente definidos do peso molecular.

Para preparação do gel de agarose (1,2%), foram misturados 1,2 g de agarose (Sigma) a cada 100 mL da solução tampão (Tampão Tris base 40 mmol/L, ácido acético glacial 20 mmol/L e EDTA sódico 2 mmol/L; em pH 8). Após solubilização da agarose através de aquecimento e agitação, foram adicionados 6 µL de GelRed™ concentrado (Biotium). Depois de pronta, a mistura foi colocada em um molde para montagem do gel com a utilização de um pente com 15 depressões colocado na parte superior do molde, para formar os poços de aplicação das amostras.

Após polimerização da agarose (1,2%), foi retirado o pente e o gel foi colocado em uma cuba de eletroforese, sendo imerso na solução tampão (Tampão Tris base 40 mmol/L, ácido acético glacial 20 mmol/L e EDTA sódico 2 mmol/L; em pH 8). Aos 15 poços formados no gel, três foram utilizados para o peso molecular (dois nas extremidades do gel e um no meio), com adição de 3 µL em cada poço, e 12 foram utilizados para as amostras provenientes das reações de PCR, aplicando em cada poço 10 µL de seguinte mistura: 7 µL de amostra com 3 µL do corante blue juice (ficoll, SDS, azul de bromofenol, xylene cyanol e EDTA sódico 0,1 mol/L; em pH 8). Após aplicação das amostras, a cuba foi fechada e o gel foi submetido à tensão elétrica de aproximadamente 100 V por uma a duas horas, dependendo da migração das amostras através do gel.

Na eletroforese, foram utilizados dois pesos moleculares diferentes. O peso molecular de 1 Kb plus DNA ladder (Invitrogen) foi utilizado para a eletroforese das amostras provenientes da 1ª PCR para VP7 e VP4, pois sua migração através do gel gera bandas com tamanhos conhecidos que variam entre si pela presença de 100 pb (Figura 7B). Esse padrão de bandas gera dados suficientes para diferenciação das bandas provenientes da 1ª PCR, porém não é suficiente para diferenciar os resultados obtidos com a eletroforese das amostras provenientes da 2ª PCR. Por isso, foi utilizado o peso molecular 50 pb DNA ladder (Invitrogen) na eletroforese das amostras

provenientes da 2ª PCR para VP7 e VP4, pois sua migração através do gel gera bandas com tamanhos conhecidos que variam entre si pela presença de 50 pb e com isso se torna um ótimo padrão para a diferenciação e consequente genotipagem das bandas resultantes da 2ª PCR (Figura 7A).

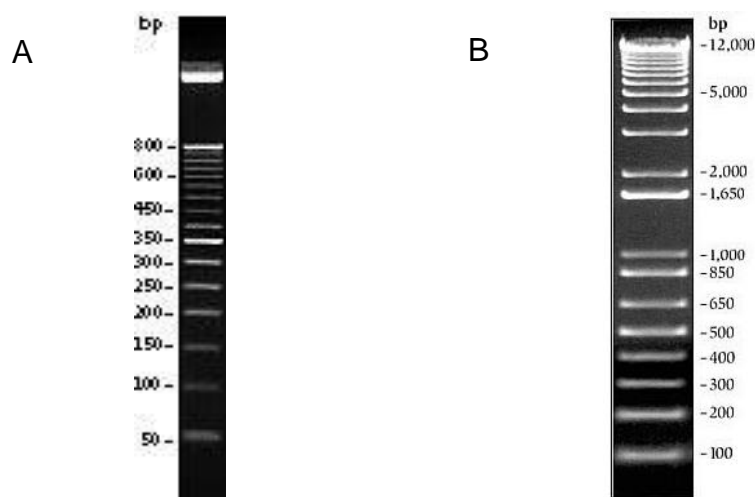


Figura 7: Exemplo da migração de bandas ao longo do gel de agarose para os pesos moleculares 50 pb DNA ladder (A) e 1 Kb plus DNA ladder (B) após a eletroforese

Depois de realizada a eletroforese, o gel foi exposto à luz ultravioleta em um fotodocumentador (L-Pix Chemi - Locus Biotecnologia) para visualização das bandas obtidas e registro fotográfico. A partir desse registro, foi realizada análise dos resultados das reações de PCR (RT-PCR e Semi-nested) de ambas as proteínas do capsídeo externo, com base nas bandas geradas pela eletroforese dos pesos moleculares utilizados.

A reação de RT-PCR para as proteínas VP7 e VP4, como já citado anteriormente, tem por objetivo a amplificação do gene correspondente a cada uma dessas proteínas. Com isso, o resultado positivo para estas reações seria a presença de uma banda com tamanho de 1062 pb para VP7 e 876 pb para VP4. A partir do registro fotográfico da eletroforese, foi possível analisar as bandas obtidas, comparando-as ao peso molecular, para verificação da presença ou não das bandas com tamanhos respectivos aos de interesse (1062 pb e 876 pb).

A reação de PCR Semi-nested para as proteínas VP7 e VP4, como já citado anteriormente, tem por objetivo a amplificação de uma porção específica dos genes dessas proteínas, que corresponde ao genótipo presente na amostra estudada. A partir

do registro fotográfico da eletroforese, foi possível analisar as bandas obtidas, comparando-as ao peso molecular, para definir o tamanho de cada um delas. Com isso, foi possível estabelecer o genótipo da amostra de acordo com o tamanho da banda encontrada (Quadro 9).

Quadro 9: Tamanho do segmento de DNA formado na 2ª PCR (Semi-nested) correspondente a cada genótipo de VP7 e VP4

|     |      | Tamanho do segmento de DNA formado |
|-----|------|------------------------------------|
| VP7 | G1   | 158 bp                             |
|     | G2   | 244 bp                             |
|     | G3   | 466 bp                             |
|     | G4   | 403 bp                             |
|     | G5   | 723 bp                             |
|     | G9   | 110 bp                             |
| VP4 | P[4] | 483 bp                             |
|     | P[6] | 267 bp                             |
|     | P[8] | 345 bp                             |
|     | P[9] | 391 bp                             |

### 3.10 Testes confirmatórios

Depois de analisar os resultados obtidos com a genotipagem de VP7 e VP4, algumas amostras não puderam ter seu genótipo claramente definido ou apresentaram resultado negativo. Para essas amostras foram realizados alguns testes confirmatórios, conforme descrito abaixo.

#### 3.10.1 Amostras com genotipagem negativa para VP7 e/ou VP4

Todas as amostras que apresentaram resultado negativo nas reações de PCR para VP7 e/ou VP4 foram confirmadas através de novas reações de PCR utilizando mais ou menos volume de amostra (10 µL ou 3µL de dsRNA) na 1ª PCR, com o objetivo de avaliar se a negatividade se deu por pouca quantidade de RNA viral ou por excesso do mesmo. A partir do produto desta 1ª PCR com mais ou menos amostra, foi realizada a 2ª PCR nas condições descritas anteriormente e com o produto desta reação foi realizada a eletroforese em gel de agarose, para definir o genótipo de rotavírus presente naquelas amostras (Figura 8 e 9).

Para realização da 1ª PCR para VP7 e VP4 com maior ou menor volume de amostra (10 µL ou 3 µL dsRNA), a reação deve ser realizada da mesma forma que a 1ª PCR já descrito anteriormente, com exceção do volume de água destilada ultra pura que é adicionado à mistura de reagentes. Neste caso, a quantidade de água destilada ultra pura a ser adicionada é de 9,2 µL e 16,2 µL, para as reações com mais ou menos amostra, respectivamente.

Como observado neste estudo, a PCR para VP7 se mostrou mais sensível do que a PCR para VP4. Com isso, as amostras que continuaram negativas após as reações confirmatórias de VP7 com 10 µL e 3µL de dsRNA não foram testadas nestas condições para VP4 (Figura 8).

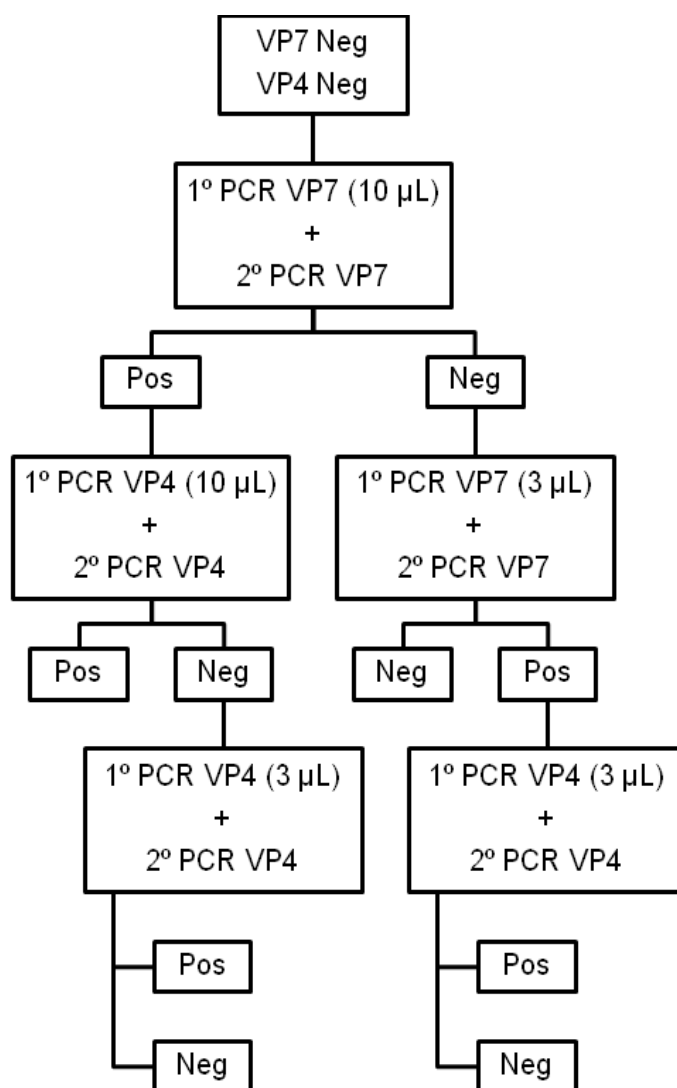


Figura 8: Fluxograma para confirmação de amostras que apresentaram resultado negativo na genotipagem de VP7 e VP4

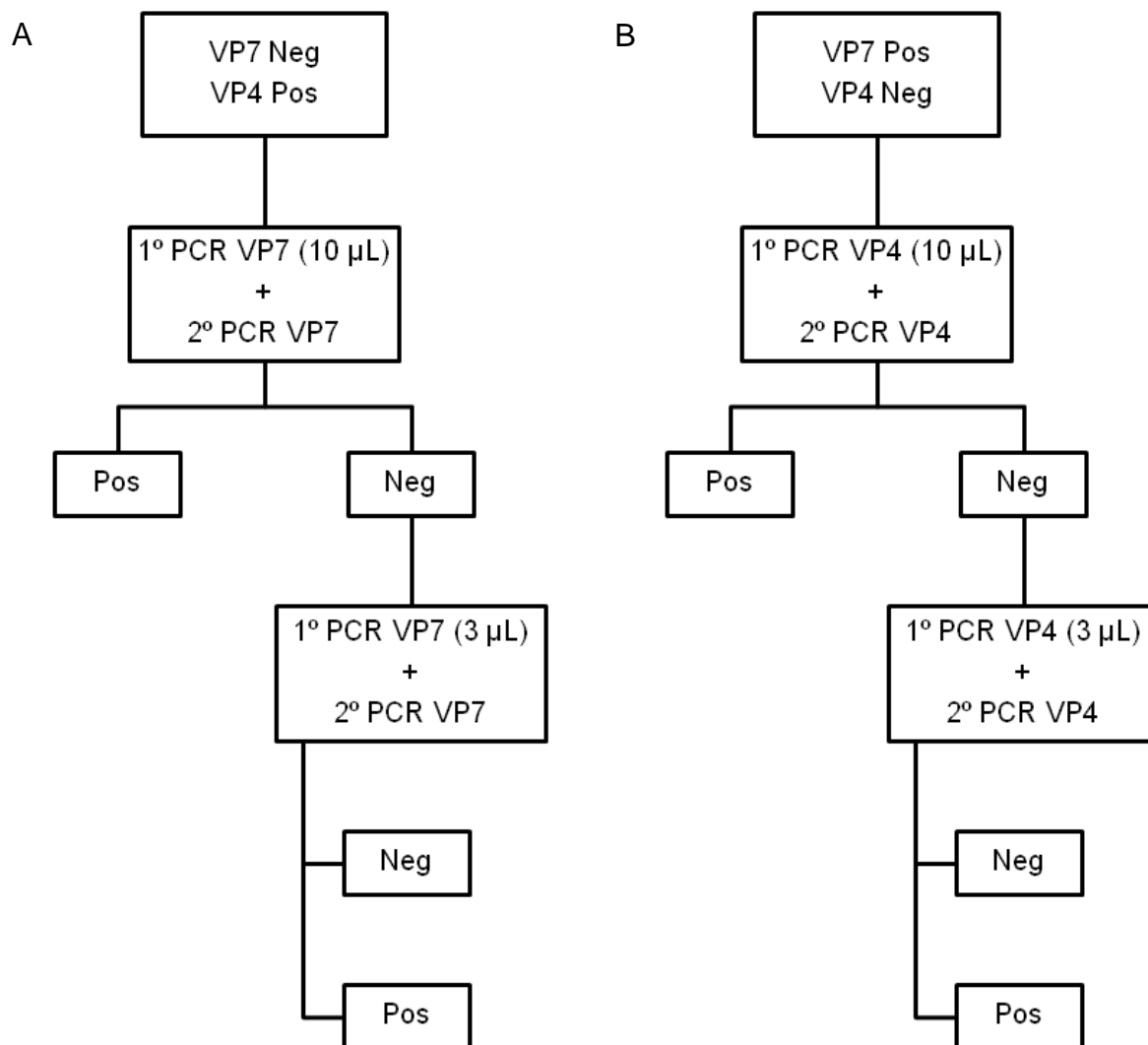


Figura 9: A) Fluxograma para confirmação de amostras que apresentaram resultado negativo na genotipagem de VP7 e resultado positivo na genotipagem de VP4. B) Fluxograma para confirmação de amostras que apresentaram resultado positivo na genotipagem de VP7 e resultado negativo na genotipagem de VP4

### 3.10.2 Teste para diferenciação entre genótipos P[8] e P[9]

Durante a análise dos resultados das reações de genotipagem através da eletroforese em gel de agarose, algumas amostras não puderam ter sua banda positiva para VP4 claramente definida como sendo genótipo P[8] ou P[9], pois o tamanho correspondente a esses genótipos são muito parecidos e não foi possível distingui-los na eletroforese. A banda correspondente ao genótipo P[8] apresenta fragmento de DNA com tamanho de 345 pb, enquanto que a banda do genótipo P[9] apresenta tamanho de 391 pb. Neste contexto, duas novas reações de genotipagem para VP4

foram realizadas para cada uma dessas amostras e posteriormente analisadas através da eletroforese em gel de agarose. Essas duas reações de genotipagem, compreendendo, em cada uma delas, a 1ª e 2ª PCR para VP4, foram realizadas nas mesmas condições descritas anteriormente, com exceção da composição do *pool* de *primers*. Para uma das reações o *pool* de *primers* foi substituído por um *pool* de *primers* correspondente somente ao genótipo P[8] e, para a outra reação, foi substituído por um *pool* de *primers* correspondente somente ao genótipo P[9]. Dessa forma, o aparecimento de banda na altura de 300 a 400 pb na eletroforese da 2ª PCR, indica presença do genótipo P[8] na reação em que utilizou *primers* para P[8] e a presença do genótipo P[9] na reação em que adicionamos *primers* correspondentes a P[9]. Com isso foi possível confirmar o genótipo de VP4 presente na amostra.

### 3.10.3 Teste para diferenciação entre genótipos G1 e G9

Durante a análise dos resultados das reações de genotipagem através da eletroforese em gel de agarose, algumas amostras não puderam ter sua banda positiva para VP7 claramente definida como sendo genótipo G1 ou G9, pois o tamanho correspondente a esses genótipos são muito parecidos e não foi possível distingui-los na eletroforese. A banda correspondente ao genótipo G1 apresenta fragmento de DNA com tamanho de 158 pb, enquanto que a banda do genótipo G9 apresenta tamanho de 110 pb. Neste contexto, duas novas reações de genotipagem para VP7 foram realizadas para cada uma dessas amostras e, posteriormente, analisadas através da eletroforese em gel de agarose. Essas duas reações de genotipagem, compreendendo, em cada uma delas, a 1ª e 2ª PCR para VP7, foram realizadas nas mesmas condições descritas anteriormente, com exceção da composição do *pool* de *primers*. Para uma das reações, o *pool* de *primers* foi substituído por um *pool* de *primers* correspondente somente ao genótipo G1 e para a outra reação foi substituído por um *pool* de *primers* correspondente somente ao genótipo G9. Dessa forma, o aparecimento de banda na altura de 100 a 200 pb na eletroforese da 2ª PCR, indica presença do genótipo G1 na reação em que utilizou *primers* para G1 e a presença do genótipo G9 na reação em que adicionamos *primers* correspondentes a G9. Com isso foi possível confirmar o genótipo de VP7 presente na amostra.

#### **3.10.4 Diluição 1/100**

Algumas amostras apresentaram resultado positivo na reação da 1ª PCR para VP7 e VP4 (confirmando presença do rotavírus) e resultado negativo na 2ª PCR para VP7 e/ou VP4, não sendo possível identificar o genótipo VP7 e/ou VP4 do vírus. Com isso foi realizado teste confirmatório da 2ª PCR utilizando o produto da reação da 1ª PCR diluído 100 vezes (1/100). Este teste foi realizado com o intuito de solucionar o problema do excesso de cDNA na amostra para a reação da 2ª PCR.

## **4- RESULTADOS**



#### 4.1 Padronização das reações de PCR (RT-PCR e Semi nested)

As reações de PCR utilizadas neste estudo já estão bem consolidadas na literatura. Com isso, a partir da utilização de amostras padrão dos genótipos G1, G2, G3, G4, G5 e G9, correspondente à VP7 e P[4], P[6] e P[8] correspondentes à VP4, foi possível reproduzir e evidenciar a amplificação dos genes relacionados a estes genótipos do rotavírus. Dessa maneira, as reações foram padronizadas para posterior utilização com o intuito de identificar o genótipo presente. As figuras 10 e 11 representam o resultado final das reações de RT-PCR e PCR Semi nested (Gouvea *et al*, 1990; Gentsch *et al*, 1992; Espínola *et al*, 2008).

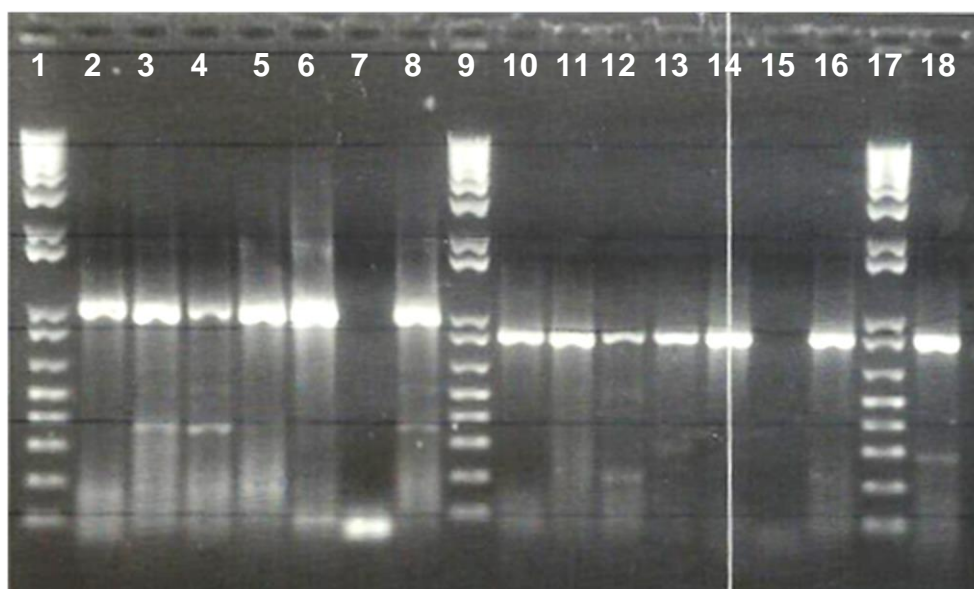


Figura 10: Eletroforese em gel de agarose dos produtos obtidos com a RT-PCR para VP7 e VP4. Canaletas (1, 9 e 17) – Peso molecular 1 Kb / Canaletas (2 a 6) – VP7 / Canaletas (10 a 14 e 18) – VP4 / Canaletas (7 e 15) – controle negativo (H<sub>2</sub>O) usado na RT-PCR de VP7 e VP4, respectivamente / Canaletas (8 e 16) – controle positivo usado na RT-PCR de VP7 e VP4, respectivamente

#### 4.2 Caracterização demográfica

No decorrer do ano de 2009, foram recebidas, para realização deste estudo, 223 amostras de fezes com resultado positivo para rotavírus. Essas amostras vieram de duas regiões brasileiras diferentes (Sudeste e Nordeste) e a positividade foi definida através da metodologia de imunocromatografia, realizadas na rotina dos laboratórios de origem. Após realização das reações de PCR, 48 amostras não confirmaram a

presença do rotavírus pela PCR, enquanto que 175 confirmaram e foram genotipadas de acordo com as sequências do genoma correspondente às proteínas VP7 e VP4. Em relação a idade desses pacientes, observou-se que a média etária foi de 6,15 anos e a mediana foi de 1 ano. A análise dos dados demográficos (sexo e idade), do período do ano de coleta e da região de origem dessas 48 amostras nas quais não se confirmou a presença de rotavírus por PCR, demonstrou não haver diferença significativa em relação àquelas nas quais se confirmou a presença do RNA viral (Tabela 1, Quadro 10, Figura 12 e 13).

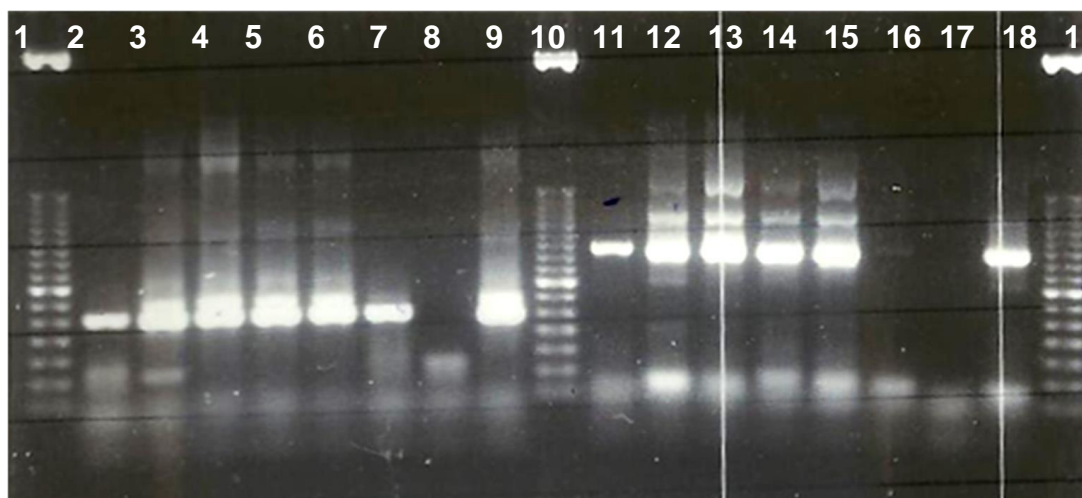


Figura 11: Eletroforese em gel de agarose dos produtos obtidos com a PCR Semi-nested para VP7 e VP4. Canaletas (1, 10 e 19) – Peso molecular 50 pb / Canaletas (2 a 7) – VP7 / Canaletas (11 a 16) – VP4. Canaletas (8 e 17) – controle negativo (H<sub>2</sub>O) usado na PCR Semi-nested de VP7 e VP4, respectivamente. Canaletas (9 e 18) – controle positivo usado na PCR Semi-nested de VP7 e VP4, respectivamente

Tabela 1: Classificação das amostras que não confirmaram presença de rotavírus na reação de PCR de acordo com a faixa etária dos pacientes

| Faixa Etária     | Nº de Amostras |
|------------------|----------------|
| 0 - 2 anos       | 37             |
| 3 - 4 anos       | 2              |
| 5 - 10 anos      | 0              |
| 11 - 20 anos     | 1              |
| 21 - 30 anos     | 0              |
| 31 - 40 anos     | 3              |
| 41 - 50 anos     | 0              |
| Acima de 50 anos | 0              |
| Sem informação   | 5              |
| <b>TOTAL</b>     | <b>48</b>      |

Quadro 10: Classificação das amostras que não confirmaram presença de rotavírus na reação de PCR de acordo com a região brasileira de origem

| Local           | Nº de Amostras |
|-----------------|----------------|
| Região Nordeste | 27             |
| Região Sudeste  | 21             |

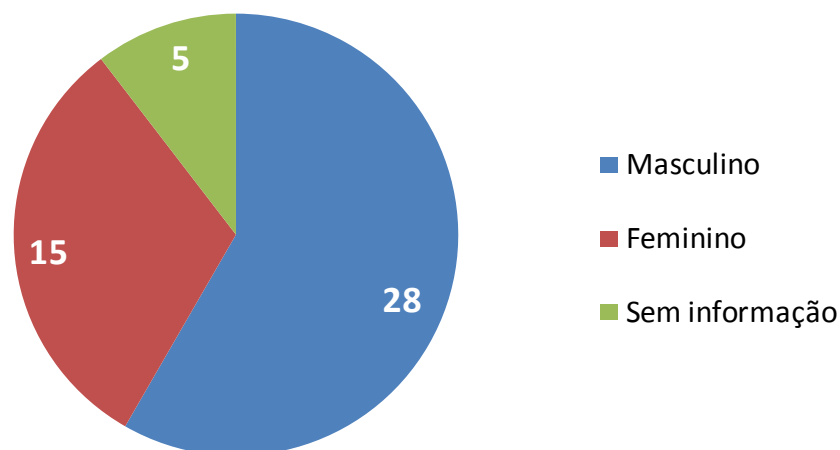


Figura 12: Classificação das amostras que não confirmaram presença de rotavírus na reação de PCR de acordo com o sexo dos pacientes

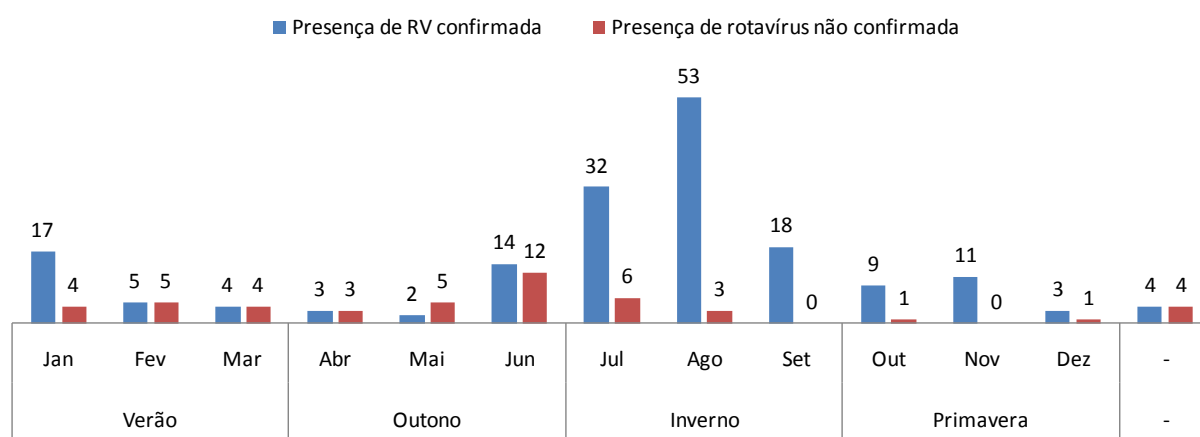


Figura 13: Classificação das amostras que confirmaram e não confirmaram a presença do rotavírus na reação de PCR de acordo com a data da coleta

A partir da definição das amostras que confirmaram presença do rotavírus na reação de PCR, foi realizado levantamento dos dados demográficos de cada amostra.

Analisando as amostras de acordo como sexo dos pacientes, verificou-se que 50,9% das amostras eram de mulheres (n= 89/175), 45% de homens (n=79/175) e em 4% das amostras (n=7/175), não foi possível obter informação do sexo do paciente (Quadro 11).

Quadro 11: Classificação das amostras com resultado positivo para rotavírus na reação de PCR, de acordo com o sexo dos pacientes

| Sexo           | Nº de Amostras |
|----------------|----------------|
| Feminino       | 89             |
| Masculino      | 79             |
| Sem informação | 7              |

De acordo com a faixa etária dos pacientes, observou-se que mais da metade das amostras (59,4%;n=104/175) correspondem a crianças entre 0 e 10 anos de idade e destes, 48 amostras (27,4%; 48/175) correspondem à faixa etária de 0 a 2 anos. Destaca-se também, o percentual de casos positivos para rotavírus na faixa etária acima de 50 anos, que correspondeu a 9,1% dos casos (n=16/175). Ainda em relação à idade dos pacientes, observou-se que a média etária foi de 15,58 anos e a mediana foi de 6 anos (Tabela 2).

Tabela 2: Classificação das amostras com resultado positivo para rotavírus na reação de PCR, de acordo com a faixa etária dos pacientes

| Faixa Etária     | Nº de Amostras | %            |
|------------------|----------------|--------------|
| 0 - 2 anos       | 48             | 27,4         |
| 3 - 4 anos       | 25             | 14,3         |
| 5 - 10 anos      | 31             | 17,7         |
| 11 - 20 anos     | 12             | 6,9          |
| 21 - 30 anos     | 19             | 10,9         |
| 31 - 40 anos     | 8              | 4,6          |
| 41 - 50 anos     | 7              | 4,0          |
| Acima de 50 anos | 16             | 9,1          |
| Sem informação   | 9              | 5,1          |
| <b>TOTAL</b>     | <b>175</b>     | <b>100,0</b> |

Com relação ao estado brasileiro de origem das amostras, observou-se que 52,6% (n=92/175) das amostras foram coletadas na região Nordeste (PE e BA) e 47,4% (n=83/175) foram coletadas na região Sudeste (SP e RJ) (Tabela 3).

Tabela 3: Classificação das amostras com resultado positivo para rotavírus na reação de PCR, de acordo com a região brasileira de origem

| Local           | Nº de Amostras | %            |
|-----------------|----------------|--------------|
| Região Nordeste | 92             | 52,6         |
| Região Sudeste  | 83             | 47,4         |
| <b>TOTAL</b>    | <b>175</b>     | <b>100,0</b> |

### 4.3 Caracterização sazonal

De acordo com a data de coleta, observou-se que a maioria das amostras com resultado positivo na reação de PCR (58,9%;n=103/175) foi detectada nos meses de inverno. Na sequência, temos 14,9% das amostras nos meses do verão (n=26/175), 13,1% das amostras nos meses de primavera (n=23/175) e 10,9% das amostras nos meses do outono (n=19/175). Quatro amostras (2,3%; n= 4/175) não puderam ter sua data de coleta definida (Figura 14).

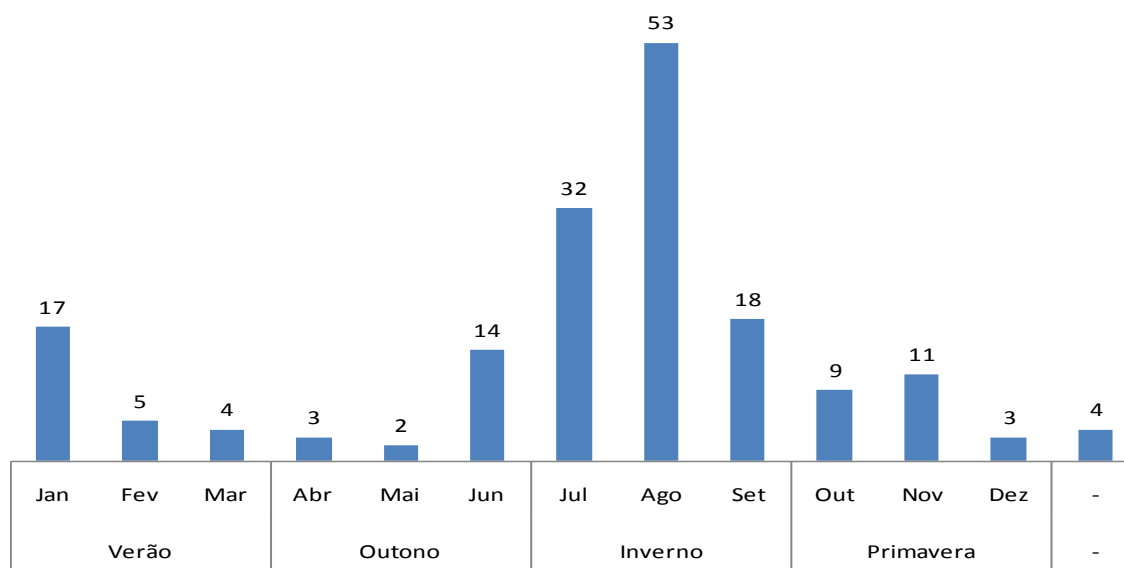


Figura 14: Classificação das amostras com resultado positivo para rotavírus na reação de PCR, de acordo com a data de coleta

Na região Sudeste (SP e RJ), pode-se observar casos em praticamente todos os meses do ano, porém sua maior concentração está nos meses de inverno, com 45,8% (n=38/83). Nos meses de Janeiro (Verão) e Junho (Outono), também foi registrado um

aumento de casos positivos para este vírus, com 14 (17%;  $n=14/83$ ) e 11 (13%;  $n=11/83$ ) casos, respectivamente (Figura 15).

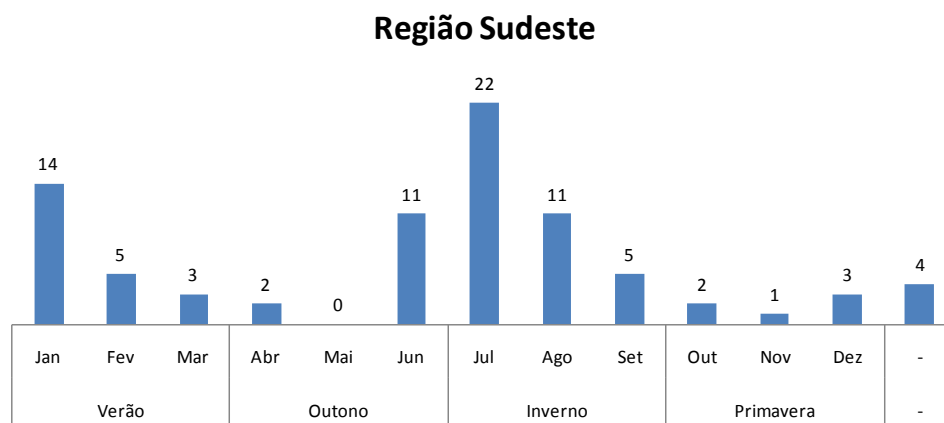


Figura 15: Classificação das amostras, provenientes da região Sudeste, com resultado positivo para rotavírus na reação de PCR, de acordo com a data de coleta

Na região Nordeste (PE e BA), 70,6% ( $n=65/92$ ) dos casos estão relacionados com amostras colhidas nos meses de inverno (Julho a Setembro), 18,5% ( $n=17/92$ ) ocorreram nos meses da primavera (Outubro e Novembro) e o restante ficou disperso nos outros meses do ano (Figura 16).

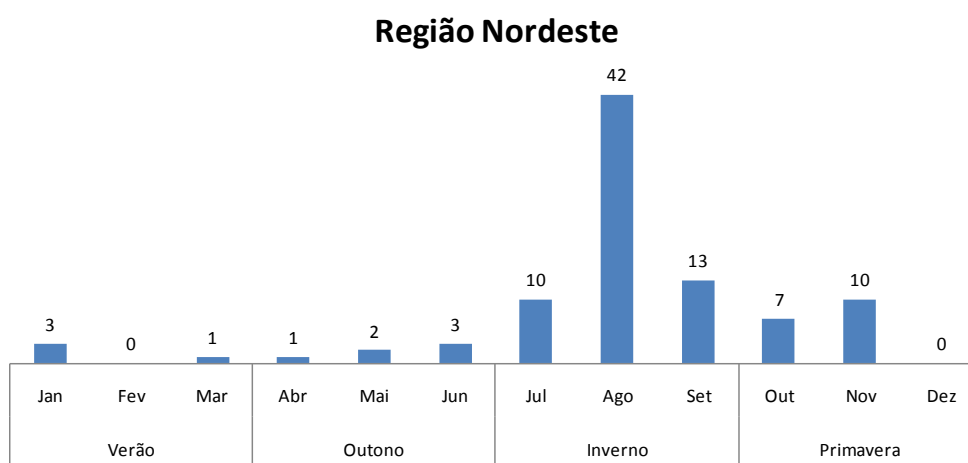


Figura 16: Classificação das amostras, provenientes da região Nordeste, com resultado positivo para rotavírus na reação de PCR, de acordo com a data de coleta

#### 4.4 Caracterização vacinal

De acordo com o questionamento dirigido aos pacientes, com idade entre 0 e 4 anos, a respeito da vacinação contra o rotavírus, observou-se que 15,1% das amostras corresponderam a pacientes que tomaram a vacina, 9,6% das amostras referem-se a pacientes que não tomaram a vacina e 75,3% correspondem a pacientes que não souberam informar, ou seja, poderiam ter tomado ou não a vacina (Tabela 4).

Tabela 4: Classificação das amostras de pacientes entre 0 e 4 anos com resultado positivo para rotavírus na reação de PCR, de acordo com a informação sobre a vacinação contra o rotavírus

| <b>Informação sobre vacina</b> | <b>%</b>     |
|--------------------------------|--------------|
| Vacinado                       | 15,1         |
| Não Vacinado                   | 9,6          |
| Não soube Informar             | 75,3         |
| <b>TOTAL</b>                   | <b>100,0</b> |

Considerando a informação sobre a vacina contra rotavírus, em pacientes com idade entre 0 e 4 anos, para cada região brasileira estudada, pode-se observar que a porcentagem de vacinados e não vacinados foi maior na região Nordeste (BA e PE), com 26,7% e 23,3%, respectivamente. Na região Sudeste (SP e RJ) o percentual de vacinados ficou em 7,0% e não houve nenhum paciente não vacinado. Com relação aos indivíduos que não souberam informar se foram ou não vacinados, o percentual foi de 93,0% na região Sudeste e 50,0% na região Nordeste (Tabela 5).

Tabela 5: Classificação das amostras de pacientes entre 0 e 4 anos com resultado positivo para rotavírus na reação de PCR, de acordo com a informação sobre a vacinação contra o rotavírus para cada região brasileira estudada

| <b>Informação sobre vacina</b> | <b>Sudeste (%)</b> | <b>Nordeste (%)</b> |
|--------------------------------|--------------------|---------------------|
| Vacinado                       | 7,0                | 26,7                |
| Não Vacinado                   | 0,0                | 23,3                |
| Não soube Informar             | 93,0               | 50,0                |
| <b>TOTAL</b>                   | <b>100,0</b>       | <b>100,0</b>        |

#### 4.5 Caracterização genotípica

A análise dos resultados da genotipagem do gene correspondente à proteína VP7 revelou que, no período e nos locais estudados, foi possível identificar a presença

dos genótipos G1, G2, G3, G4, G5 e G9. Em 6 casos, a presença do rotavírus foi confirmada pela genotipagem positiva da proteína VP4, porém não foi possível identificar o genótipo correspondente à VP7. O genótipo que mais foi encontrado nessa população, no período estudado, foi G2 com 88,0% (n=154/175), seguido por G1 com 4,6% (n=8/175) (Quadro 12). Com relação aos resultados da genotipagem para VP4, observou-se a presença dos genótipos P[4], P[6], P[8] E P[9]. Em 26 amostras, a positividade para rotavírus foi confirmada pela genotipagem da proteína VP7, porém não foi possível identificar o genótipo correspondente à VP4. O genótipo de VP4 que mais foi encontrado nessas amostras foi P[4] com 72,0% (n=126/175), seguido por P[6] com 10,3% (n=18/175) (Quadro 13).

Quadro 12: Classificação das amostras que confirmaram presença de rotavírus, de acordo com o genótipo correspondente a proteína VP7

| Genótipos VP7 |             |
|---------------|-------------|
| Genótipo      | Nº amostras |
| G2            | 154         |
| G1            | 8           |
| Indefinido    | 6           |
| G9            | 5           |
| G3            | 1           |
| G4            | 1           |
| G5            | 1           |

Quadro 13: Classificação das amostras que confirmaram presença de rotavírus, de acordo com o genótipo correspondente a proteína VP4

| Genótipos VP4 |             |
|---------------|-------------|
| Genótipo      | Nº amostras |
| P[4]          | 126         |
| Indefinido    | 26          |
| P[6]          | 18          |
| P[8]          | 9           |
| P[9]          | 2           |



Com relação às associações entre VP7 e VP4 encontradas, observou-se que 69,1% (n=121/175) correspondem à cepa G2P[4], 14,3% (n=25/175) ao genótipo G2 com genótipo VP4 indefinido, 6,9% (n=12/175) à cepa G2P[6] e 13,7% (n=24/175) às outras cepas (G1P[6], G9P[8], P[4] com VP7 indefinido, G1P[8], P[8] com VP7 indefinido, G1 com VP4 indefinido, G1P[4], G3P[9], G4P[6], G5P[8], G9 com VP4 indefinido e P[9] com VP7 indefinido) (Quadro 14).

Quadro 14: Classificação das amostras que confirmaram presença de rotavírus, de acordo com as associações encontradas entre os genótipos de VP7 e VP4

| Genótipo | Nº amostras |
|----------|-------------|
| G2P[4]   | 121         |
| G2P?     | 25          |
| G2P[6]   | 12          |
| G1P[6]   | 5           |
| G9P[8]   | 4           |
| G?P[4]   | 4           |
| G1P[8]   | 2           |
| G?P[8]   | 2           |
| G1P?     | 1           |
| G1P[4]   | 1           |
| G3P[9]   | 1           |
| G4P[6]   | 1           |
| G5P[8]   | 1           |
| G9P?     | 1           |
| G?P[9]   | 1           |

Comparando o resultado da genotipagem das amostras com a região do país proveniente, observou-se que as cepas com maior circulação foram iguais para as regiões Nordeste (PE e BA) e Sudeste (SP e RJ). Na região Nordeste, as cepas de rotavírus encontradas com maior frequência foram: G2P[4] (72,8%; n=67/92), G2 com VP4 indefinido (13,0%; n=12/92) e G2P[6] (5,4%; n=5/92), enquanto que na região Sudeste, as cepas de maior frequência foram: G2P[4] (65,1%; n=54/83), G2 com VP4 indefinido (15,7%; n=13/83), G2P[6] (8,4%; n=7/83) (Quadro 15).

Quadro 15: Classificação das cepas de rotavírus encontradas de acordo com a região brasileira de origem

|          | Nordeste    | Sudeste     |
|----------|-------------|-------------|
| Genótipo | Nº amostras | Nº amostras |
| G2P[4]   | 67          | 54          |
| G2P?     | 12          | 13          |
| G2P[6]   | 5           | 7           |
| G1P[6]   | 5           | -           |
| G9P[8]   | -           | 4           |
| G?P[4]   | 1           | 3           |
| G1P[8]   | 2           | -           |
| G?P[8]   | 1           | 1           |
| G1P?     | 1           | -           |
| G1P[4]   | 1           | -           |
| G4P[6]   | 1           | -           |
| G?P[9]   | 1           | -           |
| G3P[9]   | -           | 1           |
| G5P[8]   | -           | 1           |
| G9P?     | -           | 1           |

Com relação à presença de genótipos diferentes em um mesmo paciente, pode-se observar a presença de: 4 amostras com G2 associado a P[4] e P[6] (nos estados de PE, SP e BA), 1 amostra com G1 associado a P[4] e P[6] (no estado da BA), 1 amostra com G2 e G9 sem VP4 definido (no estado de SP) e 1 amostra com P[8] e P[9] sem VP7 definido (no estado da BA).

Para os pacientes, com idade entre 0 e 4 anos, que foram vacinados contra rotavírus, pode-se observar que 91,0% das cepas encontradas correspondem ao genótipo G2 associado a P[4] ou ao genótipo VP4 indefinido e 9,0% correspondem ao genótipo G1P[4]/P[6]. Para os indivíduos que não foram imunizados contra o rotavírus, observou-se que 85,7% apresentaram cepas do genótipo G2 associado a P[4] ou ao genótipo VP4 indefinido e 14,3% correspondem ao genótipo G4P[6] (Tabela 6).

Tabela 6: Genótipos correspondentes aos pacientes com idade entre 0 e 4 anos, que souberam informar se foram ou não vacinados contra rotavírus

| Genótipo     | Não Vacinado (%) | Vacinado (%) |
|--------------|------------------|--------------|
| G1P[4]/P[6]  | -                | 9,0          |
| G2P?         | 14,3             | 45,5         |
| G2P[4]       | 71,4             | 45,5         |
| G4P[6]       | 14,3             | -            |
| <b>TOTAL</b> | <b>100,0</b>     | <b>100,0</b> |

## **5- DISCUSSÃO**

Dentre as amostras recebidas de laboratórios das regiões Sudeste (São Paulo e Rio de Janeiro) e Nordeste (Pernambuco e Bahia), 175 amostras confirmaram a presença do rotavírus através da detecção do RNA viral pela PCR, enquanto que 48 amostras não puderam ter o RNA do rotavírus detectado e genotipado. A análise da idade dos pacientes que não confirmaram a presença do rotavírus através da PCR não demonstrou diferença relevante em relação à idade dos pacientes, em que foi possível identificar o RNA viral. Para essas 48 amostras, houve representação de casos entre crianças e adultos, sendo a maior concentração na faixa entre 0 a 2 anos. Este achado não representa viés para o estudo, visto que as complicações da infecção pelo rotavírus e consequentemente a importância do diagnóstico desse quadro são de maior relevância na população com essa faixa etária (Tabela 1 e 2). Em relação ao sexo desses 48 pacientes, observou-se boa representação de homens e mulheres com pequena diferença entre o número de casos, sendo estes dados não conflitantes com aqueles encontrados nos pacientes, nos quais foi possível detectar o RNA viral através da PCR (Figura 12 e Quadro 11). Como pode ser observado no quadro 10 e na tabela 3, o perfil da região brasileira de origem das amostras que não confirmaram a presença do RNA viral foi semelhante ao encontrado para as amostras com confirmação de RNA viral; com isso não foi possível associar a região de origem com a negatividade na reação de PCR para rotavírus. Levando-se em conta o período do ano de coleta dessas 48 amostras, nota-se que o perfil apresentado está coincidente com o observado para as amostras que tiveram confirmação da presença de rotavírus na PCR, portanto o período do ano em que as amostras foram coletadas, não está relacionado à negatividade na detecção do RNA viral pela reação de PCR (Figura 13).

Todas as amostras utilizadas neste estudo foram colhidas a partir de pacientes que foram aos laboratórios com solicitação médica para pesquisa do rotavírus em fezes. Com isso, as amostras foram mantidas a temperatura ambiente ou sob refrigeração (4 a 8°C), do momento da coleta até a realização da pesquisa de rotavírus, sendo, após este período, mantidas sob refrigeração (4 a 8°C) por 3 dias para eventuais testes confirmatórios. Após este período, foram encaminhadas, sob pouca refrigeração, para serem utilizadas neste projeto com tempo estimado de transporte de 1 a 2 dias, dependendo da localidade do laboratório de origem. Depois de serem recebidas, as amostras foram congeladas a -20°C e posteriormente, de acordo com a disponibilidade no freezer, transferidas para temperatura de -70°C até o momento de

sua utilização na reação de PCR. A pesquisa do rotavírus na rotina dos laboratórios que enviaram as amostras é realizada através do kit Vikia<sup>®</sup> Rota-Adeno (Imunocromatografia), no qual se evidencia a presença da proteína viral VP6, enquanto que a genotipagem do rotavírus, neste estudo, foi realizada através da identificação e caracterização da porção do RNA viral correspondente às proteínas VP7 e VP4 pela reação de PCR. Com isso, pode-se dizer que a estabilidade da amostra para a genotipagem é mais crítica que a estabilidade da amostra a ser analisada pela presença da proteína VP6, visto que as moléculas de RNA sofrem maior degradação em temperaturas superiores a -20°C. Em 2008, Téllez *et al* observaram que o kit Vikia<sup>®</sup> Rota-Adeno (Imunocromatografia) apresentou sensibilidade de 100% e especificidade de 24,2% frente a reação de PCR para a proteína VP7. Através da baixa especificidade observada na literatura, é possível inferir que o kit Vikia<sup>®</sup> Rota-Adeno apresenta elevado número de casos falso positivo. Dessa forma, a dificuldade com a estabilidade da amostra e a baixa especificidade do teste usado em rotina refletiu, neste estudo, através das 48 amostras que apresentaram resultado positivo na pesquisa da proteína VP6 (imunocromatografia) e resultado negativo na reação de PCR para a identificação do RNA viral. De acordo com a tabela 1, a maioria dos casos que não confirmaram presença do rotavírus na reação de PCR são de pacientes com idades entre 0 a 4 anos. Para esta faixa etária, a coleta da amostra de fezes é mais complicada e na maioria dos casos o volume de amostra é reduzido, agravando com isso a dificuldade encontrada com a estabilidade do RNA viral para a realização da PCR, visto que a quantidade reduzida de amostra será diretamente proporcional à quantidade de RNA viral. Além disso, a não detecção do RNA viral também pode estar relacionada à presença, nas fezes, de inibidores da reação de PCR.

Como pode ser visto no quadro 11, houve representatividade semelhante entre o número de pacientes do sexo masculino e feminino que confirmaram positividade para rotavírus na reação de PCR. Com relação à idade desses pacientes, observa-se na tabela 2 que houve representatividade em todas as faixas etárias. Como esperado, o maior número de casos foi observado em crianças, sendo a faixa etária com mais incidência entre 0 e 2 anos. Esse dado confirma que a suspeita de infecção pelo rotavírus continua sendo mais freqüente nesta parcela da população e ressalta a importância de um programa de vacinação eficaz. A ocorrência da infecção na população adulta está em grande parte associada à transmissão do vírus através de

crianças infectadas, sendo assim um programa de vacinação eficaz pode apresentar como efeito indireto a redução nos casos de adultos infectados pelo rotavírus (Patel *et al*, 2011; Lopman *et al*, 2012; Anderson *et al*, 2013).

De acordo com a tabela 3, não houve diferença significativa entre o número de casos de rotavírus genotipados provenientes das regiões Nordeste (Bahia e Pernambuco) e Sudeste (Rio de Janeiro e São Paulo).

Em relação à distribuição ao longo do ano, 69,7% das amostras genotipadas pela PCR se concentraram entre as estações mais frias e secas do ano, visto que nestas condições o rotavírus apresenta maior chance de sobrevivência em superfícies e proporcionalmente maior chance de transmissão. Neste contexto, a dispersão observada das infecções ao longo do ano demonstra maior semelhança com o perfil observado em países de clima temperado, onde as infecções só ocorrem entre os meses mais frios e secos do ano. Pelo observado neste estudo, a infecção pelo rotavírus nessas regiões do Brasil parece estar em um momento de transição entre o perfil observado em países com clima tropical, onde temos a ocorrência de casos dispersos ao longo de todo ano, e o perfil observado nos países de clima temperado (Figura 14). Observando a dispersão ao longo do ano para cada uma das regiões, pode-se verificar que a região Nordeste (Bahia e Pernambuco), tipicamente de clima tropical com médias de temperaturas mais elevadas e com um inverno pouco rigoroso, apresentou perfil de casos de rotavírus mais centralizados nos meses de inverno, enquanto que a região Sudeste (Rio de Janeiro e São Paulo), caracterizada por temperaturas mais baixas no inverno, apresentou maior dispersão ao longo do ano (Figura 15 e 16). Com isso, nota-se que a região Nordeste demonstrou perfil mais próximo do observado em países do clima temperado. Em concordância com os dados encontrados, Silva *et al* (2010) observaram, no estado de Pernambuco entre 2007 e 2008, que a infecção pelo rotavírus ocorreu com maior frequência entre os meses de maio a setembro (Outono e Inverno).

Dentre a população estudada com presença do rotavírus através da reação de PCR, 41,7% correspondem a pacientes com idade entre 0 e 4 anos (Tabela 2). Os dados do questionamento a respeito da vacinação destes pacientes revelaram que na maioria dos casos o paciente ou seu responsável não soube responder, ou seja, poderiam ou não ter tomado a vacina e somente 15,1% dessa população afirmou ter tomado a vacina Rotarix® (Tabela 4). Comparando estes dados de vacinação nas duas

regiões estudadas, observa-se que a região Sudeste (São Paulo e Rio de Janeiro) apresentou o maior número de casos onde a resposta foi inconclusiva e que a região Nordeste (Bahia e Pernambuco) apresentou o maior número de casos com imunização confirmada. Nota-se também que na região Sudeste todos os pacientes que souberam responder ao questionamento (7,0%) foram imunizados, enquanto que na região Nordeste, metade da população estudada soube responder ao questionamento e destes, 26,7% foram imunizados (Tabela 5). Em Pernambuco, entre 2007 e 2008, Silva *et al* (2010) observaram que em aproximadamente 15% dos casos de infecção pelo rotavírus o paciente havia sido imunizado. Dados oficiais do ministério da saúde revelam que, no ano de 2009, a cobertura vacinal para os estados de Pernambuco, Bahia, Rio de Janeiro e São Paulo foi, respectivamente, de 88,6%, 78,5%, 80,5% e 89,1% (Ministério da saúde - Datasus).

Neste estudo, a genotipagem da proteína VP7 foi realizada através de duas reações de PCR, na qual a primeira utiliza *primers* responsáveis pela amplificação total do gene e a segunda tem por objetivo somente a amplificação da região deste gene correspondente ao(s) genótipo(s) presente(s) na amostra, sendo para isso utilizado um *pool* com *primers* específicos para os genótipos G1, G2, G3, G4, G5 e G9. Dentre as 175 amostras que confirmaram a presença de rotavírus na PCR, não foi possível identificar o genótipo da proteína VP7 em 6 amostras. Em um destes casos, houve a amplificação do gene na primeira reação de PCR, porém não houve amplificação na segunda reação. Possivelmente, este dado indica que o genótipo presente nesta amostra não está entre os genótipos compreendidos pelo *pool* de *primers* escolhido para este estudo, caracterizando este genótipo como emergente ou de pouca circulação, visto que os genótipos escolhidos para serem analisados neste estudo são aqueles que apresentam maior circulação na população brasileira (Gurgel *et al*, 2008; Leite *et al*, 2008). Nos outros 5 casos, não foi possível evidenciar a amplificação do gene correspondente a VP7 na primeira e na segunda reação da PCR, sendo a confirmação da presença do rotavírus nestas amostras somente pela genotipagem do gene da proteína VP4. Na população estudada, a genotipagem da proteína VP7 revelou que houve circulação de todos os genótipos investigados (G1, G2, G3, G4, G5 e G9), sendo o genótipo G2 presente em 87,5% das amostras estudadas, seguido por G1 com 4,5% (Quadro 12). Em escala global, Santos e Hoshino (2005) verificaram que no período entre 1989 e 2004, o genótipo mais freqüente de VP7 foi G1. No Brasil,

Gurgel *et al* (2008) constataram que no período anterior a adoção da Rotarix<sup>®</sup> no calendário vacinal, entre 1986 e 2006, o genótipo mais freqüente de VP7 foi G1 com 44%, seguido por G9 com 19% e G2 com 17%. Ainda em território nacional, Leite *et al* (2008) observaram que no período entre 1982 e 2005 G1 representava o genótipo mais freqüente de VP7, representando 43% dos casos, e o genótipo G2 correspondia a 9%, enquanto que entre os anos de 2006 e 2007 (período aproximado de 1 ano após a utilização da Rotarix<sup>®</sup>) o genótipo G1 teve sua freqüência reduzida para 3% dos casos, e o genótipo G2 passou a ser a mais freqüente, com 74% dos casos, seguida por G9 com 11%. Observando somente a freqüência de G2, Leite *et al* (2008) verificaram que entre 1982 e 1995 este genótipo foi identificada em 26% dos casos, entre 1996 e 2005 a freqüência caiu para 2% e entre 2006 e 2007 foi para 74%. De acordo com o observado na literatura, o perfil dos genótipos de VP7 circulantes neste estudo está semelhante ao observado no período posterior à vacinação com Rotarix<sup>®</sup>.

Para a genotipagem das amostras de acordo com o gene correspondente à proteína VP4, utilizou-se a mesma metodologia empregada para a genotipagem de VP7, sendo o *pool de primers* utilizado na 2ª PCR correspondente aos genótipos P[4], P[6], P[8] e P[9]. Dentre as 175 amostras que confirmaram a presença do rotavírus através da reação de PCR, 26 amostras não puderam ser genotipadas para VP4. Em todas estas amostras foi observado resultado negativo para a primeira e segunda PCR de VP4, sendo a confirmação da presença do rotavírus somente pela identificação da proteína VP7. A genotipagem da proteína VP4 revelou que houve circulação dos 4 genótipos estudados (P[4], P[6], P[8] e P[9]), porém o mais freqüente, com presença em 70% das amostras, foi o genótipo P[4]. No período entre 1989 e 2004, Santos e Hoshino (2005) verificaram que os dois genótipos correspondentes a VP4 que mais circularam na população mundial foram P[8], com maior número de casos, e P[4]. Analisando o período entre 1986 e 2006 no Brasil, Gurgel *et al* (2008) constataram que antes da adoção da vacina Rotarix<sup>®</sup> no calendário vacinal oficial, os genótipos P[8], P[4] e P[6] circulavam, respectivamente, na freqüência de 75%, 10% e 6%. Em outro estudo semelhante, Leite *et al* (2008) observaram a população brasileira no período entre 1982 e 2007, sendo o período aproximado de 1 ano entre 2006 e 2007 caracterizado como posterior à adoção da Rotarix<sup>®</sup> no calendário oficial. Entre 1982 e 2005, observou-se que o genótipo P[8] esteve presente em aproximadamente 70% dos casos e o genótipo P[4] em aproximadamente 9%, em contrapartida, no período entre



2006 e 2007, o genótipo P[4] foi identificado em aproximadamente 70% dos casos e o genótipo P[8] em aproximadamente 15% dos casos. De acordo com o descrito na literatura, o perfil de prevalência observado neste estudo para os genótipos correspondentes à VP4 demonstram semelhança ao observado para o período posterior à implementação da Rotarix®.

Dentre as 175 amostras que confirmaram presença do rotavírus neste estudo, observou-se que 3% e 15% das amostras apresentaram resultado negativo nas duas reações de PCR referentes à genotipagem de VP7 e VP4, respectivamente. Possivelmente, o fato dessas amostras não terem sido genotipadas está relacionado a mutações genéticas pontuais (*drifts*), rearranjos genômicos (*shifts*) ou reestruturações gênicas (*reassortments*) ocorridas no sítio de ligação onde os *primers* deveriam se ligar e, com isso, iniciar a amplificação do RNA viral para posterior identificação através da eletroforese em gel de agarose (Taniguchi e Urasawa, 1995; Unicomb *et al*, 1999; Honma *et al*, 2007; Schnepf *et al*, 2008; Santos *et al*, 2008; Ghosh e Kobayashi, 2011; Tatte & Chitambar, 2012; Ianiro *et al*, 2013; Nakagomi *et al*, 2013).

Com relação às combinações historicamente mais usuais entre os genótipos de VP7 e VP4 (G1P[8], G2P[4], G3P[8] e G4P[8]), foi observado, neste estudo, ausência das cepas G3P[8] e G4P[8] e apenas 2 casos relacionados a cepa G1P[8]. Em contrapartida, a cepa G2P[4] foi observada em 69% das amostras. A cepa G9P[8], recentemente encontrada com maior frequência e classificada como uma cepa usual, foi relatada em 2,3% das amostras. O genótipo G5P[8] foi encontrado em apenas 1 caso, genótipo este que passou a ser observado entre os anos 80 e 90, principalmente no Brasil, e esteve presente em vários relatos, porém sempre com uma frequência baixa. Dados da literatura indicam que, ao redor do mundo entre os anos de 1989 a 2004, a cepa G1P[8] mostrou ser a associação entre VP7 e VP4 mais frequentemente encontrada. No Brasil as associações entre os genótipos de VP7 e VP4 revelam que G1P[8], G9P[8], G2P[4], G3P[8], G4P[8] e G5P[8], foram, em ordem crescente de circulação, as cepas mais frequentes no período entre 1982 a 2005. Após 2006, ano em que a vacina Rotarix® foi contemplada no calendário vacinal brasileiro, houve uma inversão na circulação das cepas. A associação G2P[4] passou a ser a mais frequente, enquanto que a cepa G1P[8] assumiu o papel da terceira associação entre VP7 e VP4 mais comum (Santos e Hoshino, 2005; Carmona *et al*, 2006; Gurgel *et al*, 2008; Leite *et al*, 2008, Cilli *et al*, 2011).

Aproximadamente 5% de todos os casos de infecções por rotavírus são causadas por cepas com associação não usual entre os genótipos de VP7 e VP4. Entre essas cepas não usuais, destacam-se na literatura alguns exemplos: G1P[4], G1P[6], G2P[6], G3P[4], G3P[9], G4P[6], G8P[4], G10P[9], G9P[12] e G3P[3] (Santos e Hoshino, 2005; Gentsch *et al* 2005, Leite *et al*, 2008; Luchs *et al*, 2012). Neste estudo, foram encontradas as seguintes associações não usuais de VP7 e VP4: G1P[4], G1P[6] G2P[6], G3P[9] e G4P[6]. Esses genótipos foram encontrados em 18 casos de infecção, correspondendo a 10% dos casos com presença de rotavírus confirmadas pela reação de PCR.

Dados da literatura revelam que casos de infecção por dois ou mais genótipos de rotavírus (Infecção mista) ocorrem na frequência de 15% nos países da América do Sul. Acredita-se que estas infecções ocorram com maior frequência em regiões onde há maior diversidade e circulação de cepas incomuns (Santos e Hoshino, 2005; Gentsch *et al* 2005). No presente estudo, observou-se a ocorrência de 7 casos de infecções mistas, representando 4% dos casos com presença de rotavírus confirmada pela reação de PCR. Dentre estes casos, em 4 amostras houve presença dos genótipos P[4] e P[6] associados a G2, 1 amostra com presença de P[4] e P[6] associados a G1, 1 amostra com os genótipos G2 e G9 com VP4 indefinido e 1 amostra com os genótipos P[8] e P[9] com VP7 indefinido.

Comparando as regiões estudadas (Sudeste e Nordeste) de acordo com os genótipos de rotavírus encontrados, observou-se que os 3 genótipos mais frequentes (G2P[4], G2 com VP4 indefinido e G2P[6]) foram semelhantes para as duas regiões, estando presentes em aproximadamente 87% das amostras. Entre as cepas historicamente mais usuais do rotavírus, temos que G1P[8] foi encontrado somente na região Nordeste em apenas 2 casos, G2P[4] foi o genótipo com maior circulação nas duas regiões e os genótipos G9P[8] e G5P[8] foram encontrados somente na região Sudeste em aproximadamente 5% e 1% das amostras, respectivamente. Entre as associações não usuais de genótipos VP7 e VP4, observou-se na região Nordeste a circulação das cepas G1P[6], G1P[4], G4P[6] e G2P[6], em aproximadamente 12% das amostras, enquanto que na região Sudeste as cepas observadas foram G3P[9] e G2P[6], em aproximadamente 9% dos casos. Com relação aos casos de infecção mista, observou-se frequência de 5% na região Nordeste e 2% na região Sudeste. No Nordeste foram encontradas 3 amostras com os genótipos P[4] e P[6] associados a G2,

1 amostra com os genótipos P[4] e P[6] associados a G1 e 1 amostra com os genótipos P[8] e P[9] associados a VP7 indefinido, enquanto que na região Sudeste foi observado 1 amostra com os genótipos G2 e G9 associados a VP4 indefinido e 1 amostra com os genótipos P[4] e P[6] associados a G2.

Comparando os genótipos circulantes entre os indivíduos deste estudo que souberam informar se foram ou não vacinados, pode se observar que G2 apresentou frequência de 91% entre os vacinados e 86% entre os não vacinados. Diversos estudos relacionados à circulação das cepas de rotavírus após a utilização da Rotarix<sup>®</sup> no calendário vacinal têm demonstrado aumento considerável na frequência dos genótipos G2P[4] e G9P[8], em conjunto com a redução de casos relacionados às cepas G1P[8], G3P[8] e G4P[8]. Eventualmente, a pressão seletiva exercida pela vacinação fez com que mesmo a população não vacinada venha a ser acometida pelas cepas predominantes entre os indivíduos vacinados.

No estado do Sergipe, Gurgel *et al* (2007) observaram que, no período entre novembro de 2006 a fevereiro de 2007, todos os casos encontrados de rotavírus foram relacionados com a cepa G2P[4]. Em outro estudo, Gurgel *et al* (2009) verificaram que entre outubro de 2006 e Abril de 2008 a cepa G2P[4] foi encontrada em 95% das amostras analisadas em Sergipe.

Na cidade de Recife, Nakagomi *et al* (2008) relataram queda no número de casos de rotavírus após a introdução da Rotarix<sup>®</sup>, porém todos os casos observados foram do genótipo G2.

Na cidade do Rio de Janeiro, Carvalho-Costa *et al* (2009), observaram que a cepa G2P[4] foi encontrada em 1,4%, 44% e 96% das amostras analisadas nos anos de 2005, 2006 e 2007, respectivamente.

Na cidade de Parauapebas, localizada no estado do Pará, Mascarenhas *et al* (2010) verificaram que a cepa G2P[4] esteve presente em 90% das amostras entre os anos de 2006 e 2008.

No estado de São Paulo, Cilli *et al* (2011) observaram que o genótipo G9P[8] foi o mais frequente no ano de 2006 e G2P[4] foi a cepa mais frequente nos anos de 2007, 2008 e 2009. Em outro estudo, Carmona (2010) verificou que a frequência da cepa G2P[4] foi de 62% entre os anos de 2007 e 2009, sendo o único genótipo encontrado em 2007. Na cidade de São Paulo, Sáfadi *et al* (2010) observaram que entre crianças

hospitalizadas por quadro de gastroenterite aguda causada pelo rotavírus a prevalência da cepa G2P[4] foi de 15% no ano de 2006, 70% em 2007 e 100% em 2008.

Em um estudo conduzido, na cidade de Belém, com crianças hospitalizadas por gastroenterite grave causada pelo rotavírus entre os anos de 2008 e 2009, Justino *et al* (2011) relataram que a cepa predominante foi G2P[4].

Dulgheroff *et al* (2012), relataram que no estado de Minas Gerais houve predominância do genótipo G2P[4] entre os anos de 2009 e 2010.

Na cidade de Curitiba, Pereira *et al* (2013) realizaram um estudo epidemiológico de pacientes hospitalizados entre 2001 e 2008. Neste estudo, foi observado que após a adoção da Rotarix<sup>®</sup>, em 2006, a cepa de rotavírus mais prevalente foi G2P[4].

Carvalho-Costa *et al* (2011), em um estudo abrangendo 18 estados brasileiros, verificaram que no ano de 2005 o genótipo G9 associado a P[8] ou a VP4 indefinido foi a cepa mais encontrada, estando presente em 52% das amostras analisadas. Entre os anos de 2006 a 2009, observaram que o genótipo G2 associado a P[4] ou a VP4 indefinido foi a cepa mais frequente nessa população, estando presente em 49%, 66%, 85% e 37,5% das amostras analisadas em cada ano, respectivamente. Em contrapartida, os genótipos G1 e G3 associados a P[8] ou a VP4 indefinido apresentaram queda em sua frequência desde 2005.

Entre 2007 e 2009, Kirkwood *et al* (2011) observaram, na Austrália, aumento da cepa G2[4] nos estados que utilizam a Rotarix<sup>®</sup> em seu programa de imunização.

Em concordância com o observado na literatura para o período posterior a introdução da Rotarix<sup>®</sup> em território nacional, observou-se nesse estudo a predominância de aproximadamente 83% do genótipo G2 associado ao genótipo P[4] ou associado a um genótipo VP4 indefinido, a ausência dos genótipos G3P[8] e G4P[8] e somente 2 casos relacionados a cepa G1P[8], representando aproximadamente 1% das amostras estudadas. Mesmo não obtendo a informação referente à aplicação ou não da vacina em 75% dos indivíduos com idade entre 0 e 4 anos, foi possível observar, neste estudo, mudança no perfil de circulação das cepas de rotavírus nas regiões estudadas. Nota-se aumento considerável na predominância do genótipo G2P[4], que alguns autores acreditam estar relacionado a quadros de infecções mais. Há necessidade de se realizar outros estudos para se verificar as razões para esse aumento do genótipo 2 e, eventualmente, introduzir modificações na fórmula vacinal.

## 6- CONCLUSÕES

- 
- 1) De acordo com distribuição temporal das amostras coletadas ao longo de 2009, foi observado que a infecção pelo rotavírus ocorreu durante todo o ano, porém o período entre os meses de junho e setembro (final do outono e inverno) demonstrou ser o período de maior ocorrência da infecção pelo rotavírus.
  - 2) Comparando as duas regiões estudadas, observou-se que na região Nordeste (Bahia e Pernambuco) a distribuição dos casos fora do período entre junho e setembro ocorreu com menor frequência do que na região Sudeste (São Paulo e Rio de Janeiro).
  - 3) Em relação à faixa etária, observou-se a presença do vírus em todas as idades, sendo em maior quantidade nas crianças entre 0 e 2 anos.
  - 4) Dentre os genótipos de VP7 encontrados, somente G2 circulou nas duas regiões estudadas. Os genótipos G1 e G4 circularam somente na região Nordeste (Bahia e Pernambuco) e os genótipos G3, G5 e G9 circularam somente na região Sudeste (São Paulo e Rio de Janeiro). Em relação aos genótipos de VP4 encontrados (P[4], P[6], P[8] e P[9]), todos eles circularam nas duas regiões.
  - 5) A associação entre os genótipos G2 e P[4] demonstrou ser a mais prevalente nas regiões Nordeste (Bahia e Pernambuco – 72,8%) e Sudeste (São Paulo e Rio de Janeiro – 65,1%).

## **7- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

Adams WR, Kraft LM. Epizootic diarrhea of infant mice: identification of the etiologic agent. *Science*. 1963;141(3578):359-360.

Aiyar J, Bhan MK, Bhandari N, Kumar R, Raj P, Sazawal S. Rotavirus-specific antibody response in saliva of infants with rotavirus diarrhea. *J Infect Dis*. 1990;162(6):1383-4.

Anderson EJ, Shippee DB, Weinrobe MH, Davila MD, Katz BZ, Reddy S, et al. Indirect protection of adults from rotavirus by pediatric rotavirus vaccination. *Clin Infect Dis*. 2013;56(6):755-60.

Awachat PS, Kelkar SD. Dual infection due to simian G3-human reassortants and G9 strains of rotavirus in child and subsequent spread of serotype G9, leading to diarrhea among grandparents. *J Med Virol*. 2006;78(1):134-8.

Ball JM, Tian P, Zeng CQ, Morris AP, Estes MK. Age-dependent diarrhea induced by a rotaviral nonstructural glycoprotein. *Science*. 1996;272(5258):101-4.

Bányai K, Esona MD, Mijatovic S, Kerin TK, Pedreira C, Mercado J, et al. Zoonotic bovine rotavirus strain in a diarrheic child, Nicaragua. *J Clin Virol*. 2009;46(4):391-3.

Bass DM, Baylor MR, Chen C, Mackow EM, Bremont M, Greenberg HB. Liposome-mediated transfection of intact viral particles reveals that plasma membrane penetration determines permissivity of tissue culture cells to rotavirus. *J Clin Invest*. 1992;90(6):2313-20.

Bern C, Unicomb L, Gentsch JR, Banul N, Yunus M, Sack RB, et al. Rotavirus diarrhea in Bangladeshi children: correlation of disease severity with serotypes. *J Clin Microbiol*. 1992;30(12):3234-8.

Bishop RF, Davidson GP, Holmes IH, Ruck BJ. Virus particles in epithelial cells of duodenal mucosa from children with acute non-bacterial gastroenteritis. *Lancet*. 1973;2(7841):1281-3.



Both GW, Bellamy AR, Mitchel DB. Rotavirus protein structure and function. *Curr Top Microbiol Immunol*. 1994;185:67-105.

Burns JW, Siadat-Paiouh M, Krishnaney AA, Greenberg HB. Protective effect of rotavirus VP6-specific IgA monoclonal antibodies that lack neutralizing activity. *Science*. 1996;272(5258):104-7.

Candeias JA, Rosenberg CP, Racz ML. Identification of rotavirus by counter-immunoelectrophoresis in cases of infantile diarrhea. *Rev Saúde Pública*. 1978;12(1):99-103.

Cardemil CV, Cortese MM, Medina-Marino A, Jasuja S, Desai R, Leung J, et al. Two rotavirus outbreaks caused by genotype G2P[4] at large retirement communities: cohort studies. *Ann Intern Med*. 2012;157(9):621-31.

Carmona RCC. Diversidade genética dos rotavírus humanos detectados em pacientes com diarreia aguda no estado de São Paulo, no período de 1996 a 2006 [Tese]. São Paulo: Universidade de São Paulo; 2010.

Carmona RC, Timenetsky Mdo C, Morillo SG, Richtzenhain LJ. Human rotavirus serotype G9, São Paulo, Brazil, 1996-2003. *Emerg Infect Dis*. 2006;12(6):963-8.

Carvalho-Costa FA, Araújo IT, Santos de Assis RM, Fialho AM, de Assis Martins CM, Bóia MN, et al. Rotavirus genotype distribution after vaccine introduction, Rio de Janeiro, Brazil. *Emerg Infect Dis*. 2009;15(1):95-7.

Carvalho-Costa FA, Volotão Ede M, de Assis RM, Fialho AM, de Andrade Jda S, Rocha LN, et al. Laboratory-based rotavirus surveillance during the introduction of a vaccination program, Brazil, 2005-2009. *Pediatr Infect Dis J*. 2011;30(1):S35-41.

Centers for Disease Control and Prevention. Intussusception among recipients of rotavirus vaccine--United States, 1998-1999. *Morb Mortal Wkly Rep*. 1999;48(27):577-81.

Ciarlet M, Estes MK. Human and most animal rotavirus strains do not require the presence of sialic acid on the cell surface for efficient infectivity. *J Gen Virol*. 1999;80(Pt 4):943-8.

Cilli A, Luchs A, Morillo SG, Costa FF, Carmona RC, Timenetsky MC. Characterization of rotavirus and norovirus strains: a 6-year study (2004-2009). *J Pediatr*. 2011;87(5):445-9.

Clemens J, Rao M, Ahmed F, Ward R, Huda S, Chakraborty J, et al. Breast-feeding and the risk of life-threatening rotavirus diarrhea: prevention or postponement? *Pediatr*. 1993;92(5):680-5.

Cook SM, Glass RI, LeBaron CW, Ho MS. Global seasonality of rotavirus infections. *Bull World Health Organ*. 1990;68(2):171-7.

Cox MJ, Azevedo RS, Nokes DJ, Beards GM, McCrae MA, Massad E, et al. Seroepidemiology of group A rotavirus in suburban São Paulo, Brazil. *Epidemiol Infect*. 1998;120(3):327-34.

Das BK, Gentsch JR, Cicirello HG, Woods PA, Gupta A, Ramachandran M, et al. Characterization of rotavirus strains from newborns in New Delhi, India. *J Clin Microbiol*. 1994;32(7):1820-22.

Dennehy PH. Rotavirus vaccines: an overview. *Clin Microbiol. Rev*. 2008;21(1):198-208.

Dormitzer PR, Nason EB, Prasad BV, Harrison SC. Structural rearrangements in the membrane penetration protein of a non-enveloped virus. *Nature*. 2004;430(7003):1053-8.

Duan ZJ, Li DD, Zhang Q, Liu N, Huanq CP, Jianq X, et al. Novel human rotavirus of genotype G5P[6] identified in a stool specimen from a Chinese girl with diarrhea. *J Clin Microbiol*. 2007;45(5):1614-7.

Dulgheroff AC, Figueiredo EF, Moreira LP, Moreira KC, Moura LM, Gouvêa VS, et al. Distribution of rotavirus genotypes after vaccine introduction in the Triângulo Mineiro region of Brazil: 4-Year follow-up study. *J Clin Virol.* 2012;55(1):67-71.

Espínola EE, Parra GI, Russomando G, Arbiza J. Genetic diversity of the VP4 and VP7 genes affects the genotyping of rotaviruses: Analysis of Paraguayan strains. *Infect Gen Evol.* 2008;8:94-9.

Estes MK, Cohen J. Rotavirus gene structure and function. *Microbiol Rev.* 1989;53(4):410-49.

Estes MK, Kapikian AZ. Rotaviruses. In: Knipe DM, Howley PM, Griffin DE, Lamb RA, Martin MA, Roizman B, et al (eds). *Fields Virology*. 5th ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2007.

Estes MK, Palmer EL, Obijeski JF. Rotaviruses: a review. *Curr Top Microbiol Immunol.* 1983;105:123-84.

Fang ZY, Ye Q, Ho MS, Dong H, Qing S, Penaranda ME, et al. Investigation of an outbreak of adult diarrhea rotavirus in China. *J Infect Dis.* 1989;160(6):948-53.

Fay KE, Lai J, Bocchini Jr JA. Update on childhood and adolescent immunizations: selected review of US recommendations and literature: part 1. *Curr Op Pediatr.* 2011;23:460-9.

Feeney SA, Mitchell SJ, Mitchell F, Wyatt DE, Fairley D, McCaughey C, et al. Association of the G4 rotavirus genotype with gastroenteritis in adults. *J Med Virol.* 2006;78(8):1119-23.

Fernelius AL, Ritchie AE, Classick LG, Norman JO, Mebus CA. Cell culture adaptation and propagation of a reovirus-like agent of calf diarrhea from field outbreak in Nebraska. *Arch Gesamte Virusforsch.* 1972;37:114-30.

Fischer TK, Bresee JS, Glass RI. Rotavirus vaccines and the prevention of hospital-acquired diarrhea in children. *Vaccine*. 2004;22(suppl 1):49-54.

Flewett TH, Bryden AS, Davies H. Virus particles in gastroenteritis. *Lancet*. 1973;2(7844):1497.

Flewett TH, Bryden AS, Davies H. Diagnostic electron microscopy of faeces. I – The viral flora of the faeces as seen by electron microscopy. *J Clin Pathol*. 1974;27(8):603-8.

Gentsch JR, Glass RI, Woods P, Gouvea V, Gorziglia M, Flores J, et al. Identification of group A rotavirus gene 4 types by polymerase chain reaction. *J Clin Microbiol*. 1992;30(6):1365-73.

Gentsch JR, Laird AR, Bielfelt B, Griffin DD, Banyai K, Ramachandran M, et al. Serotype diversity and reassortment between human and animal rotavirus strains: implications for rotavirus vaccine programs. *J Infect Dis*. 2005;192(suppl 1):146-59.

Gentsch JR, Woods PA, Ramachandran M, Das BK, Leite JP, Alfieri A, et al. Review of G and P typing results from a global collection of rotavirus strains: implications for vaccine development. *J Infect Dis*. 1996;174(suppl 1):30-6.

Gerna G, Forter J, Parea M, Sarasini A, Di Matteo A, Baldanti F, et al. Nosocomial outbreak of neonatal gastroenteritis caused by a new serotype 4, subtype 4B human rotavirus. *J Med Virol*. 1990;31(3):175-82.

Ghosh S, Kobayashi N. Whole-genomic analysis of rotavirus strains: current status and future prospects. *Future Microbiol*. 2011;6(9):1049-65.

Giaquinto C, Dominiak-Felden G, Damme PV, Myint TTH, Maldonado YA, Spoulou V, et al. Summary of effectiveness and impact of rotavirus vaccination with the oral pentavalent rotavirus vaccine: A systematic review of the experience in industrialized countries. *Hum Vaccin*. 2011;7(7):734-48.

Glass RI, Parashar UD, Bresee JS, Turcios R, Fischer TK, Widdowson MA, et al. Rotavirus vaccines: current prospect and future challenges. *Lancet*. 2006;368(9532):323-32.

Gleizes O, Desselberger U, Tatochenko V, Rodrigo C, Salman N, Giaginto C, et al. Nosocomial rotavirus infection in european countries: a review of the epidemiology, severity and economic burden of hospital-acquired rotavirus disease. *Pediatr Infect Dis. J*. 2006;25(1):12-21.

Gorziglia M, Nishikawa K, Hoshino Y, Taniguchi K. Similarity of the outer capsid protein VP4 of the Gottfried strain of porcine rotavirus to that of asymptomatic human rotavirus strains. *J Virol* 1990;64(1):414-8.

Gouvea V, Brantly M. Is rotavirus a population of reassortants? *Trends Microbiol*. 1995;3(4):159-62.

Gouvea V, Glass RI, Woods P, Taniguchi K, Clark HF, Forrester B. Polymerase chain reaction amplification and typing of rotavirus nucleic acid from stool specimens. *J Clin Microbiol*. 1990;28(2):276-82.

Gouvea V, Santos N, Timenetsky MC. Identification of bovine and porcine rotavirus G types by PCR. *J Clin Microbiol*. 1994;32(5):1338-40.

Goveia MG, Ciarlet M, Owen KE, Ranucci CS. Ann. N.Y. Development, clinical evaluation, and post-licensure impact of RotaTeq, a pentavalent rotavirus vaccine. *Ann N Y Acad Sci*. 2011;1222:14-8.

Graham DY, Estes MK. Proteolytic enhancement of rotavirus infectivity: biology mechanism. *Virology*. 1980;101(2):432-9.

Grimwood K, Lambert, SB. Rotavirus vaccine: opportunities and challenges. *Hum Vaccin*. 2009;5(2):57-69.

Gurgel RG, Bohland AK, Vieira SC, Oliveira DM, Fontes PB, Barros VF, et al. Incidence of rotavirus and all-cause diarrhea in northeast Brazil following the introduction of a national vaccination program. *Gastroenterology*. 2009;137(6):1970-5.

Gurgel RQ, Cuevas LE, Vieira SCF, Barros VCF, Fontes PB, Salustino EF, et al. Predominance of rotavirus P[4]G2 in a Vaccinated Population, Brazil. *Emerg Infect Dis*. 2007. 13(10):1571-3.

Gurgel RQ, Cunliffe NA, Nakagomi O, Cuevas LE. Rotavirus genotypes circulating in Brazil before national rotavirus vaccination: a review. *J Clin Virol*. 2008;43(1):1-8.

Heaton PM, Ciarlet M. The Pentavalent Rotavirus Vaccine: Discovery to Licensure and Beyond. *Clin Infect Dis*. 2007;45:1618-24.

Honma S, Chizhikov V, Santos N, Tatsumi M, Timenetsky Mdo C, Linhares AC, et al. Development and validation of DNA microarray for genotyping group A rotavirus VP4 (P[4], P[6], P[8], P[9], and P[14]) and VP7 (G1 to G6, G8 to G10, and G12) genes. *J Clin Microbiol*. 2007;45(8):2641-8.

Hoshino Y, Kapikian AZ. Rotavirus antigens. *Curr Top Microbiol Immunol*. 1994;85: 179-227.

Hoshino Y, Kapikian AZ. Rotavirus serotypes: classification and importance in epidemiology, immunity, and vaccine development. *J Health Popul Nutr*. 2000;18(1):5-14.

Hua J, Chen X, Patton JT. Deletion mapping of the rotavirus metalloprotein NS53 (NSP1): the conserved cysteine-rich region is essential for virus-specific RNA binding. *J Virol*. 1994;68(6):3990-4000.

Hung T, Chen GM, Wang CG, Yao HL, Fang ZY, Chao TX, et al. Waterborne outbreak of rotavirus diarrhoea in adults in China caused by a novel rotavirus. *Lancet*. 1984;1(8387):1139-42.

Hyser JM, Estes MK. Rotavirus Vaccines and Pathogenesis: 2008. *Curr Opin Gastroenterol*. 2009;25(1):36-43.

Ianiro G, Heylen E, Delogu R, Zeller M, Matthijnssens J, Ruggeri FM, et al. Genetic diversity of G9P[8] rotavirus strains circulating in Italy in 2007 and 2010 as determined by whole genome sequencing. *Infect Genet Evol*. 2013;16:426-32.

Jolly CL, Beisner BM, Holmes IH. Rotavirus infection of MA104 cells is inhibited by Ricinus lectin and separately expressed single binding domains. *Virology* 2000;275(1):89-97.

Justino MC, Linhares AC, Lanzieri TM, Miranda Y, Mascarenhas JD, Abreu E, et al. Effectiveness of the monovalent G1P[8] human rotavirus vaccine against hospitalization for severe G2P[4] rotavirus gastroenteritis in Belém, Brazil. *Pediatr Infect Dis J*. 2011;30(5):396-401.

Justino MC, Araújo EC, van Doorn LJ, Oliveira CS, Gabbay YB, Mascarenhas JD, et al. Oral live attenuated human rotavirus vaccine (Rotarix™) offers sustained high protection against severe G9P[8] rotavirus gastroenteritis during the first two years of life in Brazilian children. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2012;107(7):846-53.

Kapikian AZ, Hoshino Y, Chanock RM, Pérez-Schael I. Efficacy of a quadrivalent rhesus rotavirus-based human rotavirus vaccine aimed at preventing severe rotavirus diarrhea in infants and young children. *J Infect Dis*. 1996;174(suppl 1):S65-72.

Kapikian AZ, Hoshino Y, Chanock RM. Rotaviruses. In: Knipe DM, Howley PM, Griffin DE, Martin MA, Lamb RA, Roizman B, et al. (eds). *Fields Virology*. 4<sup>th</sup> ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2001.

Kane EM, Turcios RM, Arvay ML, Garcia S, Bresee JS, Glass RI. The epidemiology of rotavirus diarrhea in Latin America. Anticipating rotavirus vaccines. *Rev Panam Salud Publica*. 2004;16(6):371-7.

Kim HW, Brandt CD, Kapikian AZ, Wyatt RG, Arrobio JO, Rodriguez WJ, et al. Human reovirus-like agent infection. Occurrence in adult contacts of pediatric patients with gastroenteritis. JAMA. 1977;238(5):404-7.

Kirkwood CD, Boniface K, Barnes GL, Bishop RF. Distribution of rotavirus genotypes after introduction of rotavirus vaccines, Rotarix® and RotaTeq®, into the National Immunization Program of Australia. Pediatr Infect Dis J. 2011;30(1):S48-53.

Kuzuya M, Fujii R, Hamano M, Nagabayashi T, Tsunemitsu H, Yamada M, et al. Rapid detection of human group C rotaviruses by reverse passive hemagglutination and latex agglutination tests using monoclonal antibodies. J Clin Microbiol. 1993;31(5):1308-11.

Lanata CF, Midthun K, Blach RE, Butron B, Huapaya A, Penny ME, et al. Safety, immunogenicity, and protective efficacy of one and three doses of the tetravalent rhesus rotavirus vaccine in infants in Lima, Peru. J Infect Dis. 1996;174(2):268-75.

Lawton JA, Zeng CQY, Mukherjee SK, Cohen J, Estes MK, Prasad BVV. Three-dimensional structural analysis of recombinant rotavirus-like particles with intact and amino-terminal-deleted VP2: Implications for the architecture of the VP2 capsid layer. J Virol. 1997;71(10):7353-60.

Leite JP, Carvalho-Costa FA, Linhares AC. Group A rotavirus genotypes and the ongoing Brazilian experience: a review. Mem Ins Oswaldo Cruz. 2008;103(8):745-53.

Li D-d, Duan Z-j, Zhang Q, Liu N, Xie Z-p, Jiang B, Steele D, Jiang X, Wang Z-s, Fang Z-y. Molecular characterization of unusual human G5P[6] rotaviruses identified in China. J Clin Virol. 2008;42:141-8.

Lijima Y, Iwamoto T, Nukuzuma S, Ohishi H, Hayashi K, Kobayashi N. An outbreak of rotavirus infection among adults in an institution for rehabilitation: long-term residence in a closed community as a risk factor for rotavirus illness. Scand. J Infect Dis. 2006;38(6-7):490-6.



Linhares AC, Bresee JS. Rotavirus vaccines and vaccination in Latin America. *Rev Panam Salud Publica*. 2000;8(5): 305-31.

Linhares AC, Gabbay YB, Mascarenhas JDP, Freitas RB, Oliveira CS, Bellesi N, et al. Immunogenicity, safety and efficacy of tetravalent rhesus-human, reassortant rotavirus vaccine in Belém, Brazil. *Bull World Health Organ*. 1996;74(5):491-500.

Linhares AC, Pinheiro FP, Freitas RB, Gabbay YB, Shirley JA, Beards GM. An outbreak of rotavirus diarrhea among a nonimmune, isolated South American Indian community. *Am J Epidemiol*. 1981;113(6):703-10.

Linhares AC, Pinheiro FP, Schmetz C, Muller G, Peters D. Duovirus (Rotavirus) in Belem, State of Para, Brazil (preliminary report). *Rev Inst Med Trop São Paulo*. 1977;19(4):278-9.

Linhares AC. Rotavirus infection in Brazil: epidemiology and challenges for its control. *Cad Saude Publica*. 2000;16(3):629-46.

Liprandi F, Lopez G, Rodrigues I, Hidalgo M, Ludert JE, Mattion N. Monoclonal antibodies to the VP6 of porcine subgroup I rotaviruses reactive with subgroup I and non-subgroup I non-subgroup II strains. *J Gen Virol*. 1990;71:1395-8.

Lopez S, Arias CF. Multistep entry of rotavirus into cells: a Versaillesque dance. *Trends Microbiol*. 2004;12(6):271-8.

Lopman BA, Payne DC, Tate JE, Patel MM, Cortese MM, Parashar UD. Post-licensure experience with rotavirus vaccination in high and middle income countries; 2006 to 2011. *Curr Opin Virol*. 2012;2:434-42.

Luchs A, Cilli A, Morillo SG, Carmona RC, Timenetsky MC. Rare G3P[3] rotavirus strain detected in Brazil: possible human-canine interspecies transmission. *J Clin Virol*. 2012;54(1):89-92.

Lundgren O, Peregrin AT, Persson K, Kordasti S, Uhnöo I, Svensson L. Role of the enteric nervous system in the fluid and electrolyte secretion of rotavirus diarrhea. *Science*. 2000;287(5452):491-5.

Lundgren O, Svensson L. The enteric nervous system and infectious diarrhea. In: Desselberger U, Gray J(eds). *Viral Gastroenteritis. Perspectives in Medical Virology*. Elsevier Science; 2003.

Malherb H, Harwin R. The cytopathic effects of vervet monkey viruses. *S Afr Med J*. 1963;37:407-11.

Malherbe H, Strickland-Cholmley M. Simian virus SA11 and the related O agent. *Arch Gesamte Virusforsch*. 1967;22:235-45.

Mascarenhas JD, Lima CS, de Oliveira DS, Guerra Sde F, Maestri RP, Gabbay YB, et al. Identification of two sublineages of genotype G2 rotavirus among diarrheic children in Parauapebas, Southern Pará State, Brazil. *J Med Virol*. 2010;82(4):712-9.

Matthews, REF. The Classification and nomenclature of viruses: summary of results of meeting of the International Committee on Taxonomy of Viruses, The Hague. Sep. 1978. *Intervirology*. 1979;11(3):133-5.

Matthijnssens J, Ciarlet M, McDonald SM, Attoui H, Bányai K, Brister JR, et al. Uniformity of rotavirus strain nomenclature proposed by the Rotavirus Classification Working Group (RCWG). *Arch Virol*. 2011;156(8):1397-413.

Matthijnssens J, Ciarlet M, Rahman M, Attoui H, Bányai K, Estes MK, et al. Recommendations for the classification of group A rotaviruses using all 11 genomic RNA segments. *Arch Virol*. 2008;153(8):1621-9.

McNulty, MS. Rotaviruses. *J Gen Virol*. 1978;40(1):1-18.

Mebus CA, Kono M, Underdahl NR, Twiehaus, MJ. Cell culture propagation of neonatal calf diarrhea (scours) virus. *Can Vet J.* 1971;12(3):69-72.

Mebus CA, Underdahl NR, Rhodes MB, Twiehaus, MJ. Calf diarrhea (scours): reproduced with a virus from a field outbreak. *Nebraska Agric Exp St Bull.* 1969;233:1-16.

Meloni A, Locci D, Frau G, Masia G, Nurchi AM, Coppola RC. Epidemiology and prevention of rotavirus infection: an underestimated issue? *J Matern Fetal Neonatal Med.* 2011;24(20):48-51.

Menq ZD, Birch C, Heath R, Gust I. Physicochemical stability and inactivation of human and simian rotaviruses. *Appl Environ Microbiol.* 1987;53(4):727-30.

Middleton PJ, Szymanski MT, Abbott GD, Bortolussi R, Hamilton, JR. Orbivirus of acute gastroenteritis of infancy. *Lancet.* 1974;1:1241-4.

Ministério da Saúde [Internet]. Secretaria Executiva. Datasus [acesso em jun. 2013]. Informações de Saúde. Informações de cobertura vacinal: Cobertura do imunobiológico Rotavírus humano no Brasileiro.

Disponível em: <<http://tabnet.datasus.gov.br/cgi/tabcgi.exe?pni/cnv/cpniuf.def>>.

Morris AP, Scott JK, Ball JM, Zeng CQ, O'Neal WK, Estes MK. NSP4 elicits age-dependent diarrhea and Ca(2+)-mediated I(-) influx into intestinal crypts of CF mice. *Am J Physiol.* 1999;277(2 Pt 1):G431-44.

Nakagomi T, Cuevas LE, Gurgel RG, Elrokhsi SH, Belkhir YA, Abugalia M, et al. Apparent extinction of non-G2 rotavirus strains from circulation in Recife, Brazil, after the introduction of rotavirus vaccine. *Arch Virol.* 2008;153(3):591-3.

Nakagomi T, Doan YH, Dove W, Ngwira B, Iturriza-Gómara M, Nakagomi O, et al. G8 rotaviruses with conserved genotype constellations detected in Malawi over 10 years (1997-2007) display frequent gene reassortment among strains co-circulating in humans. *J Gen Virol.* 2013;94(6):1273-95.

Offit PA. Host factors associated with protection against rotavirus disease: the skies are clearing. *J Infect Dis.* 1996;174(suppl 1):59-64.

Offit PA, Clark HF. Protection against rotavirus-induced gastroenteritis in a murine model by passively acquired gastrointestinal but not circulating antibodies. *J Virol.* 1985;54(1):58-64.

Offit PA, Dudzik KI. Rotavirus-specific cytotoxic T lymphocytes cross-react with target cells infected with different rotavirus serotypes. *J Virol.* 1988;62(1):127-31.

Parashar UD, Hummelman EG, Bresee JS, Miller MA, Glas RI. Global illness and deaths caused by rotavirus disease in children. *Emerg Infect Dis.* 2003;9(5):565-72.

Parashar UD, Gibson CJ, Bresee JS, Glass RI. Rotavirus and severe childhood diarrhea. *Emerg Infect Dis.* 2006;12(2):304-6.

Pereira LA, Ferreira CE, Turchetto GD, Nogueira MB, Vidal LR, Cruz CR, et al. Molecular characterization of rotavirus genotypes in immunosuppressed and non-immunosuppressed pediatric patients. *J Pediatr (Rio J).* 2013;89(3):278-85.

Patel MM, Parashar UD. Assessing the effectiveness and public health impact of rotavirus vaccines after introduction in immunization programs. *J Infect Dis.* 2009;200(suppl 1):S91-9.

Patel MM, Steele D, Gentsch JR, Wecker J, Glass RL, Parashar UD. Real-world impact of rotavirus vaccination. *Pediatr Infect Dis J.* 2011;30(1):S1-5.

Patton JT, Jones MT, Kalbach AN, He YW, Xiaobo J. Rotavirus RNA polymerase requires the core shell protein to synthesize the double-stranded RNA genome. *J Virol.* 1997;71(12):9618-26.

Patton JT. Structure and function of the rotavirus RNA-binding proteins. *J Gen Virol.* 1995;76 (Pt 11):2633-2644.

Pérez-schael I, Guntiñas MJ, Pérez M, Pagon V, Rojas AM, González R, et al. Efficacy of the rhesus rotavirus-based quadrivalente vaccine in infants and young children in Venezuela. *N Engl J Med.* 1997;337(17):1181-7.

Pesavento JB, Crawford SE, Estes MK, Prasad BV. Rotavirus proteins: structure and assembly. *Curr Top Microbiol Immunol.* 2006;309:189-209.

Prasad BV, Burns JW, Marietta E, Estes MK, Chiu W. Localization of VP4 neutralization sites in rotavirus by three-dimensional cryo-electron microscopy. *Nature.* 1990;343(6257):476-9.

Prasad BV, Chiu W. Structure of rotavirus. *Curr Top Microbiol Immunol.* 1994;185:9-29.  
Phua KB, Lim FS, Lau YL, Nelson EAS, Huang LM, Quak SH, et al. Rotavirus vaccine RIX4414 efficacy sustained during the third year of life: A randomized clinical trial in an Asian population. *Vaccine.* 2012;30(30):4552-7.

Riepenhoff-Talty M, Gouvea V, Evans MJ, Svensson L, Hoffenberg E, Sokol RJ, et al. Detection of group C rotavirus in infants with extrahepatic biliary atresia. *J Infect Dis.* 1996;174(1):8-15.

Rodgers FG, Hufton P, Kurzawska E, Molloy C, Morgan S. Morphological response of human rotavirus to ultra-violet radiation, heat and disinfectants. *J Med Microbiol.* 1985;20(1):123-30.

Rubilar-Abreu E, Hedlund KO, Svensson L, Mittelholzer C. Serotype G9 rotavirus infections in adults in Sweden. *J Clin Microbiol.* 2005;43(3):1374-6.

Sáfadi MA, Berezin EN, Munford V, Almeida FJ, de Moraes JC, Pinheiro CF, et al. Hospital-based surveillance to evaluate the impact of rotavirus vaccination in São Paulo, Brazil. *Pediatr Infect Dis J*. 2010;29(11):1019-22.

Santos N, Honma S, Timenetsky MC, Linhares AC, Ushijima H, Armah GE, et al. Development of a microtiter plate hybridization-based PCR-enzyme-linked immunosorbent assay for identification of clinically relevant human group A rotavirus G and P genotypes. *J Clin Microbiol*. 2008;46(2):462-9.

Santos N, Hoshino Y. Global distribution of rotavirus serotypes/genotypes and its implication for the development and implementation of an effective vaccine. *Rev Med Virol*. 2005;15(1):29-56.

Schnepf N, Deback C, Dehee A, Gault E, Perez N, Garbag-Chenon A. Rearrangements of rotavirus genomic segment 11 are generated during acute infection of immunocompetent children and do not occur at random. *J Virol*. 2008;82(7):3689-96.

Shaw AL, Rothnagel R, Chen D, Ramig RF, Chiu W, Prasad BV. Three-dimensional visualization of the rotavirus hemagglutinin structure. *Cell*. 1993;74(4):693-701.

Silva ML, Souza JR, Melo MM. Rotavirus prevalence in infants and children in the public healthcare system of the state of Pernambuco. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2010;43(5):548-51.

Smirnov YA, Kapitulets SP, Amitina NN, Ginevskaya VA, Kaverin NV. Effect of UV-irradiation on rotavírus. *Acta Virol*. 1991;35(1):1-6.

Strina A, Rodrigues LC, Cairncross S, Ferrer SR, Fialho AM, Leite JP, et al. Factors associated with rotavirus diarrhoea in children living in a socially diverse urban centre in Brazil. *Trans. R Soc Trop Med Hyg*. 2012;106(7):445-51.

Taniguchi K, Urasawa S. Diversity in rotavirus genomes. *Sem Virol*. 1995;6(2):123-31.

Tian P, Hu Y, Schilling WP, Lindsay DA, Eiden J, Estes MK. The nonstructure glycoprotein of rotavirus affects intracellular calcium levels. *J Virol*. 1994;68(1):251-7.

Tate JE, Cortese MM, Payne DC, Curns AT, Yen C, Esposito DH, et al. Uptake, impact, and effectiveness of rotavirus vaccination in the United States: Review of the first e years of postlicensure data. *Pediatr Infect Dis J*. 2011;30(1):S56-60.

Tatte VS, Chitambar SD. Diversity in the VP7 encoding genes of rotavirus strains isolated from adolescent and adult cases of acute gastroenteritis. *J Med Virol*. 2012;84(9):1481-8.

Télles CJ, Montava R, Ribes JM, Tirado MD, Buesa J. [Evaluation of two immunochromatography kits for rapid diagnosis of rotavirus infections]. *Rev Argent Microbiol*. 2008;40(3):167-70.

Thomas EE, Roscoe DL, Book L, Bone B, Brownw L, Mah V. The utility of latex agglutination assays in the diagnosis of pediatric viral gastroenteritis. *Am J Clin Pathol*. 1994;101:742-6.

Unicomb LE, Podder G, Gentsch JR, Woods PA, Hasan KZ, Faruque ASG, et al. Evidence of high-frequency genomic reassortment of group A rotavirus strains in Bangladesh: emergence of type G9 in 1995. *J Clin Microbiol*. 1999;37(6):1885-91.

Ward RL. Mechanisms of protection against rotavirus in humans and mice. *J Infect Dis*. 1996;174(suppl 1):51-8.

Widdowson MA, Meltzer MI, Zhang X, Bresee JS, Parashar UD, Glass RI. Cost-effectiveness and potential impact of rotavirus vaccination in the United States. *Pediatrics*. 2007;119(4):684-97.

Wilhelme I, Colomina J, Martín-Rodrigo D, Roman E, Sánchez-Fauquier A. New immunochromatographic method for rapid detection of rotaviruses in stool samples

---

compared with standard enzyme immunoassay and látex agglutination techniques. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 2001;20(10):741-3.

Wilhelmi I, Roman E, Sánchez-Fauguier A. Viruses causing gastroenteritis. Clin Microbiol Infect. 2003;9(4):247-62.

Zanardi LR, Haber P, Mootrey GT, Niu MT, Wharton M. Intussusception among recipients vaccine: reports to the vaccine adverse event reporting system. Pediatrics. 2001;107(6):E97.



## 8- ANEXOS

## ANEXO 1 – PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA (UNIFESP)



Universidade Federal de São Paulo  
Escola Paulista de Medicina

Comitê de Ética em Pesquisa  
Hospital São Paulo

São Paulo, 17 de junho de 2011.  
CEP 0771/11

Ilmo(a). Sr(a).

Pesquisador(a) MARCEL LEITE

Co-Investigadores: Emerson Cararo, Aripuanã Sakurada Aranha Watanabe, Celso Francisco Hernandes Granato (orientador)

Disciplina/Departamento: Infectologia da Universidade Federal de São Paulo/Hospital São Paulo

Patrocinador: Grupo Fleury S/A.

### PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA INSTITUCIONAL

Ref: Projeto de pesquisa intitulado: **“Genotipagem de rotavírus a partir de amostras obtidas de casos clínicos de zonas urbanas de capitais brasileiras”**.

CARACTERÍSTICA PRINCIPAL DO ESTUDO: Estudo epidemiológico.

RISCOS ADICIONAIS PARA O PACIENTE: Sem risco, sem procedimento invasivo.

OBJETIVOS: Realizar estudo epidemiológico com identificação das cepas de rotavírus circulantes, em âmbito nacional, na situação da recente implementação da vacina monovalente, Rotarix, no calendário vacinal..

RESUMO: Serão utilizadas aproximadamente 250 amostras de fezes coletadas no período de 01/01/2009 a 31/12/2009 da rotina de detecção de rotavírus dos pacientes do Grupo Fleury que, por pedido médico compareceram aos respectivos laboratórios para realização da pesquisa de rotavírus em fezes. As amostras para o estudo serão recolhidas no momento do descarte das fezes. Os pacientes ou seus responsáveis serão questionados, através de uma pergunta técnica no sistema informatizado de abertura de fichas, sobre a imunidade contra o rotavírus através da vacina Rotarix. Para identificação da cepa de rotavírus, será realizada extração do RNA viral empregando um kit comercial para posteriormente genotipar os genes referentes às proteínas VP4 e VP7..

FUNDAMENTOS E RACIONAL: A vacina Rotarix foi adicionada no calendário vacinal brasileiro em 2006. A vacina monovalente Rotarix é formulada com a cepa G1P de origem humana, sendo eficaz na proteção contra infecções causadas por cepas não G1P. Recentemente, alguns autores observaram aumento na prevalência da cepa G2P em alguns pontos do país e trouxeram à tona a discussão ao redor da eficácia, da vacina atualmente em uso, para as cepas não G1..

MATERIAL E MÉTODO: Estão descritos os procedimentos do estudo, apresentando carta de concordância com a pesquisa do Laboratório Fleury, bem como carta de aprovação do CEP local..

TCLE: Apresenta justificativa para não obtenção do TCLE..

DETALHAMENTO FINANCEIRO: Laboratório Fleury S A - R\$ 37938,54.

CRONOGRAMA: 24 meses.

OBJETIVO ACADÊMICO: Mestrado.

ENTREGA DE RELATÓRIOS PARCIAIS AO CEP PREVISTOS PARA: 11/6/2012 e 11/6/2013.



Universidade Federal de São Paulo  
Escola Paulista de Medicina

Comitê de Ética em Pesquisa  
Hospital São Paulo

O Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de São Paulo/Hospital São Paulo **ANALISOU e APROVOU** o projeto de pesquisa referenciado.

1. Comunicar toda e qualquer alteração do projeto e termo de consentimento livre e esclarecido. Nestas circunstâncias a inclusão de pacientes deve ser temporariamente interrompida até a resposta do Comitê, após análise das mudanças propostas.
2. Comunicar imediatamente ao Comitê qualquer evento adverso ocorrido durante o desenvolvimento do estudo.
3. Os dados individuais de todas as etapas da pesquisa devem ser mantidos em local seguro por 5 anos para possível auditoria dos órgãos competentes.

Atenciosamente,

**Prof. Dr. José Osmar Medina Pestana**  
Coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa da  
Universidade Federal de São Paulo/ Hospital São Paulo

0771/11

## ANEXO 2 – PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA (INSTITUTO FLEURY)



São Paulo, 16 de dezembro de 2008.

Ref: Projeto 2008/053

Caro Dr. Marcel Leite,

Segue o parecer final emitido pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Instituto Fleury sobre o trabalho intitulado "Genotipagem de rotavírus a partir de amostras obtidas de casos clínicos de zonas urbanas de capitais brasileiras" número CEP 2008/053.

De acordo com as normas da Resolução do Conselho Nacional de Saúde 196/96 o projeto foi avaliado por dois relatores e o parecer final é: **APROVADO**.

Atenciosamente,

**Celso F. Hernandez Granato**

Coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa do Instituto Fleury.